

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Sanidad Animal



TESIS DOCTORAL

Anoplocefalosis equina: epidemiología de la infección en España y estudio de las lesiones producidas por *Anoplocephala perfoliata*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Nélida Fernández Pato

Directores

**Aránzazu Meana Mañes
Francisco Antonio Rojo Vázquez]**

Madrid, 2016

NÉLIDA FERNÁNDEZ PATO



Anoplocefalosis equina: epidemiología
de la infección en España y estudios de
las lesiones producidas por
Anoplocephala perfoliata.

TESIS DOCTORAL 2013

Nélida Fernández Pato

2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



**Anoplocefalosis equina: epidemiología de la infección en
España y estudios de las lesiones producidas por
Anoplocephala perfoliata.**

TESIS DOCTORAL
Nélida Fernández Pato
Madrid 2013

ARÁNZAZU MEANA MAÑES Y FRANCISCO ANTONIO ROJO VÁZQUEZ, doctores en
Veterinaria.

INFORMAN:

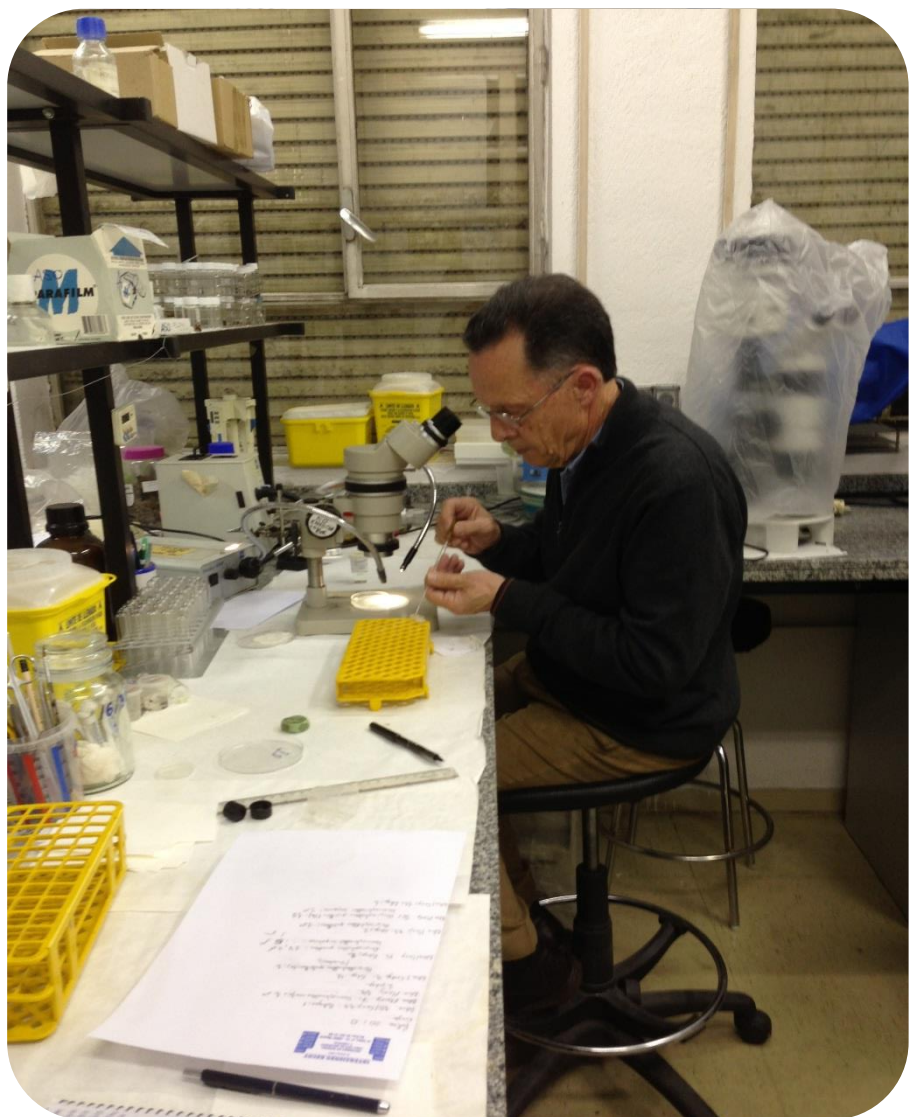
Que el trabajo titulado “Anoplocefalosis equina: epidemiología de la infección en España y estudios de las lesiones producidas por *Anoplocephala perfoliata*”, ha sido realizado por la licenciada en Veterinaria, doña Nélida Fernández Pato bajo nuestra dirección y cumple los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad española.

Madrid _____de Septiembre de 2013

Fdo Aránzazu Meana Mañes
Profesora titular de la UCM

Fdo Francisco Antonio Rojo Vázquez
Catedrático de la Universidad de León

AGRADECIMIENTOS



Agradecimientos

A mis directores de tesis, Aránzazu Meana Mañes y Francisco Antonio Rojo Vázquez “los jefes”, que han dedicado sus esfuerzos y paciencia a mi educación profesional en general y científica de forma especial, mostrándome cómo debemos plantear las preguntas adecuadas y buscar la forma más correcta de responderlas, sin olvidar que en la investigación no tienen cabida las prisas, ni existen los fines de semana, pero que la constancia y perseverancia obtienen siempre sus frutos, haciendo siempre suya una frase de Antonio Machado que a lo largo de estos años tantas y tantas veces me han repetido: “Despacito y buena letra, que el hacer las cosas bien, importa más que el hacerlas”. Sin ellos, nada de todo esto hubiese sido posible.

A los departamentos de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de Madrid y de la Facultad de Veterinaria de León, en los que he tenido la suerte de poder formarme personal y profesionalmente. Agradecer especialmente los esfuerzos desinteresados de las personas que en ellos trabajan por: formarme, por poder tener acceso a tanta y tanta información que sin su ayuda no hubiese sabido encontrar ni interpretar; por permitirme en todo momento el uso de todo el material y las instalaciones disponibles durante todos estos años.

De forma especial agradecer la ayuda técnica recibida en León de Anabel, en Madrid de Pascual, Agustín y Yobana; pero siempre y en todo momento de José Fernández Viso, mi padre.

Agradecer también al Departamento de Medicina y Cirugía de la Facultad de Veterinaria de Madrid y Hospital Clínico Veterinario de la UCM el poder utilizar en todo momento sus instalaciones; en particular la sala de necropsias, y poder contar con el apoyo del personal que allí trabaja. En especial a María Castaño que además de participar en mi formación a lo largo de la carrera, me ha ayudado en la realización e interpretación de técnicas histológicas durante mi tesis. A las personas que forman o han formado parte de Patología y Clínica de équidos, con los que como alumna y “tesinanda” he tenido la oportunidad de discutir tantos y tantos casos clínicos.

A los mataderos de León, Segovia, Guadalajara, Sevilla y Barcelona; y a Bernardino Prieto, que como veterinario director del Matadero Municipal de León además de facilitar este trabajo, me ha formado en la inspección sanitaria.

A todos los ganaderos que han colaborado con nosotros en los estudios, a los ganaderos de Babia, fue todo un privilegio medioambiental poder trabajar en ese lugar, a los del picadero “El Clac” en León y en particular a Álvaro, que tantos días hice madrugar para que me ayudase en mis tareas.

A todos y cada uno de los compañeros veterinarios que han colaborado a lo largo de estos años, de forma muy especial a mi compañero y amigo Elkin Flórez, que no sólo nos ha ayudado con los caballos sino que como veterinario de la yeguada de Haras de

Ulzama en Navarra envió durante todo un año kilos y kilos de tierra que han hecho posible gran parte de esta tesis doctoral.

A Luís Santos Subías Esteban y Guillermo M. Denegri, sin su ayuda y formación en oribátidos, seguiría buscando cómo poder llevar a cabo ese apartado.

A Sonia, que además de haber sido profesora y después compañera y amiga, me ayudó tanto en el laboratorio como en el procesado de los datos de los oribátidos.

Al Centro Apícola de Marchamalo, a las personas que en él trabajan que siempre me acogieron con una sonrisa, y de forma especial a Raquel y Alejandro de los que he aprendido tanto sobre las PCRs, y con los que he tenido la oportunidad de trabajar en cestodos equinos varios años.

A mi familia: mis padres, mis hermanos Ángel y Moni, mis sobrinos José, Gabriela, Iván y Rubén, a Raquel, Alejandro, mi abuela Nélida y a Lita, ellos saben que los agradecimientos no son mi fuerte, pero que son mi gran pilar.

A mis amigos, de universidad: Olga, algún día recordarás exactamente el día de mi cumpleaños, Alex chófer y gran amigo, Said, Gloria y Tere; parecía imposible, pero finalmente aquí está.

A Félix, que desde siempre ha estado ahí, formándome como clínica, después como docente, pero lo más importante, siempre como persona.

A Carmen y Alex, mis chicas, de las que aprendo tantas y tantas cosas y no sé si son más como veterinaria o como amiga.

A mi gente de Argentina, en especial a mi amiga “Lucha” y mi jefe Peralta.

A Coral compañera de muestreos y amiga. Y Anabel, por su fortaleza, ayuda y entrega no solo en la parte profesional, sino como gran persona que siempre ha demostrado ser.

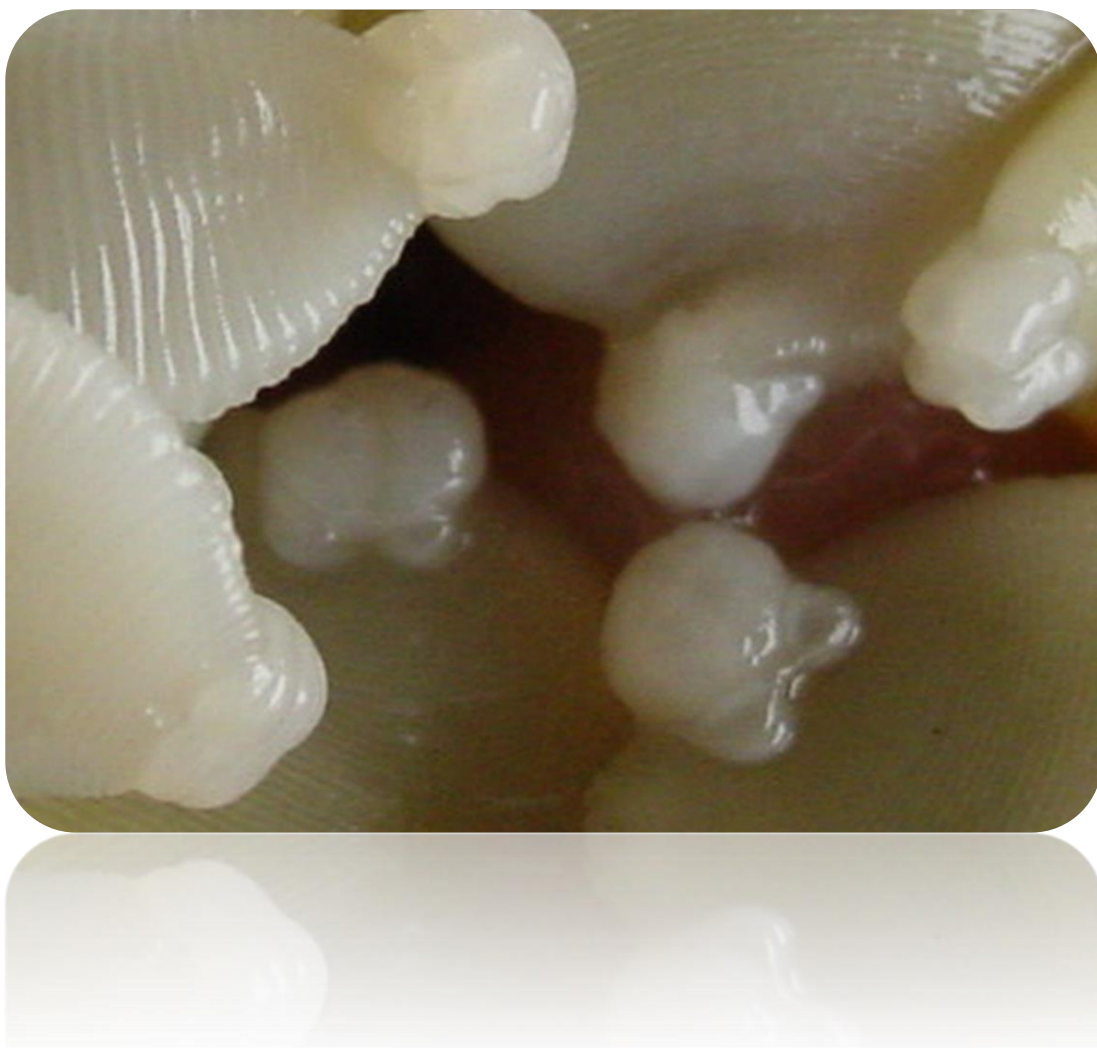
A la UAX en especial a mis alumnos y exalumnos, que han permitido y permiten mi crecimiento personal y profesional.

A Yobana, que además de ayudarme tantas y tantas veces en el laboratorio, ha conseguido hacer salir el sol, incluso a medianoche y espero que lo siga haciendo siempre.

Pero hacer una tesis es como construir una casa, hay que empezar por los cimientos, y en este caso, el último responsable de todo este trabajo y de que pueda escribir hoy estas líneas es César Colmenero, que reconstruyó donde otros no supieron, no sólo lo que estaba roto, sino que me hizo comprender que el amor y dedicación al trabajo son imprescindibles.

A mi profesor, educador, apoyo, compañero de tesis, autor de juegos parasitológicos y lo más importante: el mejor padre.

ÍNDICE



	Número de página
1 Introducción y objetivos	01
2 Antecedentes del tema	05
2.1 Sobre los agentes etiológicos	06
2.1.1 Clasificación	06
2.1.2 Morfología y localización de los Anoplocefálidos de los équidos	07
2.1.3 Desarrollo y morfología de los huevos de Anoplocefálidos	09
2.1.4 Morfología del cisticercoide	09
2.1.5 Ciclo biológico de los Anoplocefálidos	10
2.2 Sobre la patogenia de los Anoplocefálidos	12
2.3 Sobre la clínica y patología de la anoplocefalosis	14
2.4 Prevalencia	16
2.5 Sobre el control de la enfermedad: Diagnóstico, Tratamiento y Profilaxis	22
3 Material y métodos	25
3.1 Estudios en el hospedador definitivo	25
3.1.1 Material <i>post mortem</i>	25
3.1.2 Material <i>in vivo</i>	26
3.1.3 Metodología	27
3.1.3.1 Recogida y procesado de vísceras	27
3.1.2.1.1 Estudio de la intensidad de parasitación por Anoplocefálidos y grado de parasitación	28

3.1.3.2.2 Estudio de la influencia de la edad del hospedador parasitado	29
3.1.3.2 Recogida y procesado de heces	31
3.1.3.3 Recogida y procesado de sangre	31
3.1.3.4 Recogida y procesado de lesiones	31
3.2 Estudios en el hospedador intermediario	33
3.2.1 Material	33
3.2.2 Recogida y procesado: técnica de Berlese	33
3.2.2.1 Descripción de la técnica de Berlese	34
3.2.2.2 Descripción de los medios de cultivo de ácaros oribátidos en condiciones de laboratorio	36
3.2.3 Infección del hospedador intermediario	36
3.2.3.1 Infección natural	36
3.2.3.2 Infección experimental	39
3.2.3.2.1 Identificación de oribátidos infectados	45
3.3 Supervivencia de huevos	45
3.3.1 Material	45
3.3.2 Recogida y procesado	46
3.4 Estudio estadístico	47
3.4.1 Procesado de datos de la prevalencia estacional de <i>A. perfoliata</i> en el équido	47
3.4.2 Procesado de datos de la relación de la parasitación por Anoplocefálidos y edad del hospedador	47

4	Resultados	49
4.1	Estudios en el hospedador definitivo	49
4.1.1	Resultados <i>post mortem</i>	49
4.1.1.1	Prevalencia de las infecciones por <i>Anoplocephala spp.</i>	49
4.1.1.2	Intensidad de las infecciones por Anoplocefálidos	51
4.1.1.3	Alteraciones producidas por <i>A. perfoliata</i>	55
4.1.1.4	Relación entre la edad del hospedador y la intensidad de la infección	60
4.1.2	Resultados <i>in vivo</i>	68
4.2.	Estudios en el hospedador intermediario	70
4.2.1	Dinámica estacional de ácaros	70
4.2.2	Infección natural	82
4.2.3	Infección experimental	86
4.3	Supervivencia de los huevos	95
5	Discusión	101
6	Conclusiones	117
7	Resumen	119
8	Summary	123
9	Bibliografía	127

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS



En España, la ganadería equina es históricamente una de las más antiguas destacando su gran heterogeneidad que depende de factores como la raza, la localización geográfica, elementos culturales y aspectos demográficos (proximidad a grandes ciudades).

Debido a los profundos cambios socioculturales que se han producido a lo largo del siglo XX, el caballo fue sustituido en el medio rural por maquinaria agrícola y pasó a servir tanto para la producción cárnica como para actividades de ocio y nuevos fines terapéuticos que constituyen una alternativa a los tratamientos convencionales, como la hipoterapia; y, por supuesto, para el deporte.

El censo equino español ha disminuido de forma notable desde la década de los años 60 hasta el año 1999, pasando de más de dos millones de cabezas a menos de 232.000. La situación varía a partir del año 2000 y comienza un aumento en el número de animales censados.

A esta situación ha contribuido la creciente demanda de caballos para la práctica ecuestre y el ocio en general, entre los factores relacionados directamente con este cese en la disminución de número de caballos; así como el aumento del número de explotaciones equinas destinadas a la producción de carne.

Actualmente la mayoría de los animales están destinados al ocio o la competición, destacando los animales de las razas Pura Raza Árabe, Pura Raza Española o Andaluza, Trotador español, Anglo-Árabe o Hispano-Árabe.

Por su parte, las explotaciones de equinos destinadas a la producción de carne pueden dividirse en dos tipos: por un lado las que crían los équidos para la producción cárnica; y, por otro, las de engorde.

Las primeras han estado tradicionalmente limitadas al norte de España, (Navarra y Nordeste peninsular). En esas zonas, los animales viven en un régimen extensivo o generalmente en la montaña. Inicialmente, la producción de carne fue secundaria al trabajo agrícola; sin embargo, en la actualidad los cruces de razas autóctonas españolas con Bretones, Ardaneses y Comtois se utilizan específicamente para la producción cárnica o para la exportación a otros países para el mismo fin.

Las explotaciones de equinos para el engorde son de tipo intensivo o semi-intensivo y se localizan principalmente en España en la zona de Levante, en la Comunidad Valenciana y en Cataluña, aunque aparecen algunos en Navarra y la cornisa Cantábrica.

Independientemente de la orientación lúdica o productiva a la que se destinen los caballos, es indiscutible la importancia de las distintas enfermedades que pueden padecer y cuya profilaxis y control deben formar parte de cualquier planificación sanitaria de la explotación animal.

Entre las distintas patologías de los équidos, tienen especial interés los procesos infecciosos *sensu lato*, alguno de los cuales tienen carácter zoonótico, como la triquinosis; las que son de declaración obligatoria, como la peste equina, la triquinosis o la rabia y las que deben ser comunicadas anualmente y se encuentran en la Lista de la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) en las que se engloban distintas enfermedades bacterianas, víricas y otras parasitarias.

Las alteraciones o patologías del aparato digestivo de los équidos son muy frecuentes, debido en gran medida a su conformación anatómica, a la elevada sensibilidad de los caballos ante cualquier cambio en la alimentación o al inadecuado manejo.

La aparición y frecuencia de estas patologías viene determinada por la interacción de diversos factores propios tanto del animal como de las condiciones medio-ambientales en las que se encuentra, como el tipo de explotación, el clima, las condiciones de manejo y las condiciones higiénico-sanitarias.

Entre los trastornos digestivos que pueden afectar a los équidos tienen una gran importancia las enfermedades parasitarias debidas a distintos agentes patógenos que, en algunos casos, dan lugar a enfermedades parasitarias cuyas consecuencias van desde meras pérdidas en el rendimiento hasta la muerte de los animales.

Entre los parásitos digestivos que pueden afectar a los équidos, destacan los nematodos y cestodos intestinales y, en ocasiones, el parasitismo por larvas de moscas.

Los cestodos parásitos de équidos en los que se han centrado los estudios de esta memoria pertenecen a la familia *Anoplocephalidae*. Son vermes planos y acintados que se localizan en distintas regiones del aparato digestivo. Los Anoplocefálicos tienen un ciclo biológico indirecto; es decir, necesitan un hospedador intermediario en el que se desarrolla una forma larvaria (cisticercoide) que es la infectante para los équidos. Por ello, la parasitación por estos cestodos es más prevalente en los animales que se mantienen en régimen de explotación extensivo o semi-extensivo con acceso a pasto.

Se han descrito tan sólo tres especies de Anoplocefálidos capaces de parasitar a los équidos: *A. perfoliata*, *A. magna* y *Anoplocephaloides mamillana*. De ellas, la única en la que se ha comprobado una acción patógena, que constituye un factor de riesgo en el desarrollo de algunos cuadros cólicos, es *A. perfoliata*, que suele localizarse en el intestino grueso alrededor de la válvula ileocecal.

Hasta ahora las otras dos especies no se han relacionado con ninguna acción patógena.

Este hecho, ha permitido que numerosos especialistas en cirugía, patología y parasitología equina, hayan realizado estudios para conocer la prevalencia de esta parasitosis, las alteraciones que puede producir y para desarrollar y/o poner a punto nuevas técnicas de diagnóstico que faciliten el control integrado de esta parasitosis.

En España las condiciones medioambientales y el régimen de pastoreo de los équidos favorecen las infecciones por Anoplocefálidos. No obstante, las alteraciones anatómicas y funcionales que puede producir *A. perfoliata*, no han sido estudiadas hasta hace relativamente poco tiempo.

Desde hace algunos años, una de las líneas de trabajo del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM está dedicada al diagnóstico de las parasitosis gastrointestinales de los équidos, de forma especial, al estudio de los cestodos y las cestodosis equinas.

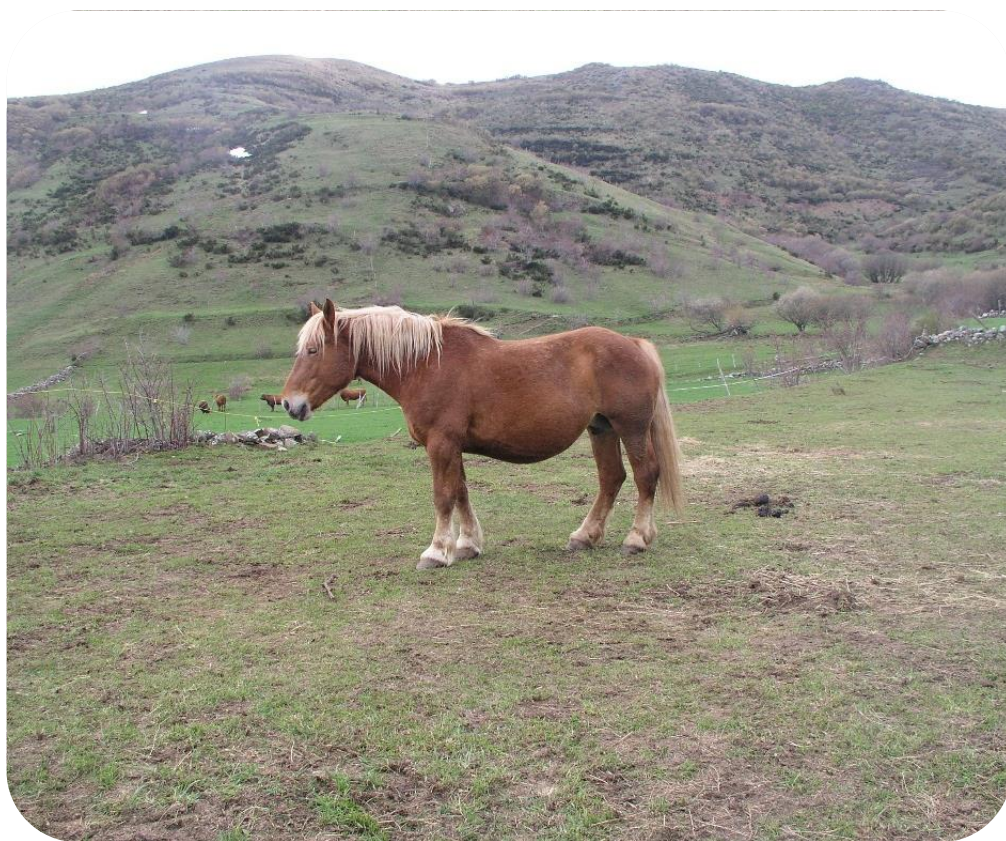
Además de estudiar la prevalencia de las distintas especies de Anoplocefálidos, el hecho de que las técnicas coprológicas utilizadas de forma rutinaria en el diagnóstico de parasitosis digestivas de équidos, tengan escasa sensibilidad, han promovido la búsqueda de nuevas técnicas de diagnóstico o la modificación de algunas “clásicas”, así como la introducción del diagnóstico inmunológico y molecular, para poder incrementar la sensibilidad y la especificidad de las técnicas coprológicas.

Por otra parte, se ha continuado el estudio de las lesiones producidas por *A. perfoliata* en la válvula ileocecal, que dan lugar a alteraciones de la motilidad intestinal y pueden contribuir a la aparición de cuadros cólicos en animales parasitados, relacionando dichas lesiones con la carga parasitaria que tienen los animales, incluyendo aportaciones gracias a estudios inmunohistoquímicos e histológicos.

La interpolación en el ciclo biológico de estos cestodos de ácaros oribátidos, que intervienen como hospedadores intermediarios, hace necesaria la ampliación de los conocimientos relacionados con ellos, centrando las investigaciones en aquellos que tienen una significación epidemiológica mayor; es decir, los que son capaces de albergar el cisticercoide (forma larvaria) en su interior. De esa manera, se amplía el conocimiento global de la fase exógena del ciclo biológico de los Anoplocefálidos.

Todos estos hechos han posibilitado comprender la necesidad del estudio de los distintos factores epidemiológicos que están implicados en la aparición de los cestodos, su importancia clínica y el impacto real de estos parásitos en la ganadería equina en España. En algunos de estos aspectos están basados los estudios realizados para presentar la memoria de esta tesis doctoral con el objetivo general de ampliar el conocimiento de estas parasitosis en équidos en España.

2. ANTECEDENTES DEL TEMA



Los cestodos que pueden afectar a los équidos pertenecen todos a la familia *Anoplocephalidae*. Son parásitos cosmopolitas, excepto *Anoplocephala rhodesiense* presente sólo en África y que parasita a cebras y *Moniezia pallida* que parasita a caballos sudafricanos. En España, hasta el momento, sólo se han denunciado: *Anoplocephala perfoliata*, *Anoplocephala magna* y *Anoplocephaloides mamillana*.

Se trata de parásitos intestinales que se alojan en su fase adulta en el intestino. Las especies *A. magna* y *A. mamillana* en intestino delgado y *A. perfoliata*, en el tercio final del intestino delgado y en intestino grueso, tanto ciego como colon, aunque tiene predilección por la unión del intestino delgado con el grueso, la válvula ileocecal.

Todos los Anoplocefálidos tienen un ciclo biológico indirecto en el que pueden actuar como hospedador intermediario, distintas especies de ácaros oribátidos superiores, que viven en las capas superficiales de la tierra.

Estos oribátidos son ubicuos y están presentes en general en cualquier tipo de suelo, aunque determinadas condiciones edáficas favorecen su desarrollo y alcanzan en estos lugares mayores tasas de reproducción apareciendo, por lo tanto, en grandes poblaciones. La composición del suelo es, por ello, un factor limitante en la presencia de estos oribátidos. En relación a otros factores climáticos hay una cierta controversia sobre el efecto de la temperatura; existe consenso al afirmar que las temperaturas medioambientales no son un factor que limite la supervivencia de estos artrópodos ya que pueden incluso superar las temperaturas invernales (Krull, 1940; Kates y Runkel, 1948), pero también hay estudios que demuestran una prevalencia mayor de oribátidos cuando la temperatura es moderada (Mitchell, 1979).

Los suelos húmedos y turbosos son más adecuados para el desarrollo y supervivencia de estos ácaros que aquellos en los que la baja humedad medioambiental, o la escasa disponibilidad de alimento, dificultan su reproducción. El tamaño de poro de la tierra donde habitan facilita su movilidad y la disponibilidad de alimento, siendo factores importantes para la reproducción de los ácaros.

El ciclo biológico de los Anoplocefálidos conlleva que estos parásitos sean más prevalentes en animales sometidos a un sistema de explotación extensivo o semi-extensivo ya que permiten la ingestión de los hospedadores intermediarios infectados, mientras los équidos pastan.

Es por ello que los animales en régimen extensivo tienen un riesgo mayor de adquirir la infección pero sin olvidar que también los animales estabulados, en paddock o box, tienen acceso al pasto. La denuncia en 1998 de que la presencia de *A. perfoliata* es un factor de riesgo en la aparición de cuadros cólicos en équidos (Proudman et al., 1998), ha estimulado el interés en estos parásitos y en los métodos para su control y, por ello, ha aumentado el conocimiento de los factores que regulan sus poblaciones y que facilitan un mayor riesgo de parasitación, tal y como demuestran el gran aumento de estudios publicados en el tema en los últimos años.

2.1 Sobre los agentes etiológicos

2.1.1 Clasificación

Los cestodos parásitos de los équidos incluyen especies pertenecientes a la Clase Cestoda, Subclase Eucestoda, Orden Cyclophyllidea. Las especies parásitas de los équidos han recibido distintas nomenclaturas a lo largo del tiempo como *Anoplocephala*, *Paranoplocephala*, *Anoplocephaloides* o *Taenia* (Wardle, McLeon y Radonovsky, 1974).

El estudio de estos parásitos de los équidos comenzó en 1782, cuando Goeze describió por primera vez la especie *Anoplocephala perfoliata*.

En 1789, Abildgaard, describió *Anoplocephala magna* y posteriormente, en 1831, Mehlis la especie *Paranocephala mamillana*, que a partir del año 1994 pasó al género *Anoplocephaloides* (Baer, 1923).

Todas las especies descritas pueden parasitar a cualquier equino (caballo, burro, mulo, cebra) y pertenecen a la familia *Anoplocephalidae* (Cholodkovky, 1902) y a la subfamilia *Anoplocephalinae* (Blanchard, 1891).

Sin embargo, el género *Anoplocephala* creado por Blanchard en 1849 en el que se pretendían agrupar todos los cestodos de los équidos, no incluyó a la especie *Anoplocephaloides mamillana*, que pasó a pertenecer al género *Anoplocephaloides* (Baer, 1923), sinónimo del género *Paranoplocephala* (Lühe, 1910).

Además de estas especies, se han descrito otros Anoplocefálidos como *Moniezia pallida* en cebras en Sudáfrica (Monning, 1925).

2.1.2 Morfología y localización de los Anoplocefálidos de los équidos

Etimológicamente, cestodo procede del latín *cestum* que significa “cinta” y del griego *oidos*, quiere decir “con el aspecto de-”; los Anoplocefálidos adultos de los équidos son vermes aplanados dorsoventralmente con morfología acintada.

La denominación de *Anoplocephala* hace referencia a la ausencia de ganchos en el escólex, al utilizar la partícula negativa *An-* delante del término *oplo*, en un símil a la ausencia de guerreros griegos denominados *hoplitas* en el extremo anterior o “cabeza” (*cephala*).

En *Anoplocephala perfoliata* (Goeze, 1782), la denominación específica hace referencia a la presencia de estructuras en forma de hoja rodeando al escólex. Mide 3,8 x 1,2 cm su escólex es casi cúbico y muy pequeño (2-3 mm de diámetro), carece de rostelo y de ganchos, pero presenta en su parte posterior dorsal y ventralmente, unos apéndices gruesos en forma de solapas que se localizan justo debajo de las ventosas, dos dorsales y dos ventrales como hojas a su alrededor. Las ventosas son casi circulares y se localizan en la porción anterior del escólex.

Morfológicamente los cestodos se encuentran divididos en tres regiones corporales: escólex; cuello o zona de crecimiento; y estróbilo que está formado por segmentos llamados proglotis.

El escólex es inerte, es decir, carece de órganos de fijación típicos de otros cestodos, como róstelo o ganchos, y sólo poseen cuatro ventosas con una potente musculatura.

El cuello, que es la región corporal que separa el escólex del estróbilo, es una zona poco diferenciada y muy corta. En su interior, contiene células germinales que originan los proglotis, en un proceso conocido como estrobilación.

El cuerpo del cestodo o estróbilo es segmentado y está formado por anillos o proglotis, que son más anchos que largos. Estos proglotis están superpuestos y en parte imbricados pareciendo estar encajados unos en otros, denominándose estróbilo craspédoto.

Los anillos que forman el cestodo en su fase adulta tienen un estado evolutivo dinámico; no todos tienen el mismo grado de desarrollo. Los que se encuentran en las primeras porciones del estróbilo son anillos inmaduros y no poseen ninguna estructura definida; después están los anillos maduros en los que se diferencian los órganos reproductores masculinos y femeninos. Y por último los anillos grávidos que posteriormente se desprenden y salen al exterior

Como otros cestodos los Anoplocefálidos son hermafroditas. Cada proglotis tiene una dotación genital doble (masculina y femenina).

A pesar de que los cestodos pueden autofecundarse la fecundación suele producirse entre dos individuos de la misma especie.

Anoplocephala perfoliata vive en el intestino grueso, en el ciego y colon, con una clara tendencia a agruparse, alrededor de la válvula ileocecal, aunque también puede localizarse en las últimas porciones del intestino delgado (Goeze, 1782).

Por su parte, *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) puede medir hasta 80 cm, aunque se debe tener en cuenta que el tamaño de los cestodos es en cualquier caso relativo, dependiendo siempre de su estado de relajación; su compleja capa muscular puede contraerse o relajarse intensamente lo que origina cambios evidentes en la longitud total. Se localiza en el intestino delgado, principalmente en el yeyuno aunque se ha descrito que puede aparecer también en el estómago (Abildgaard, 1789).

Posee un escólex grande y globoso de 4 a 6 mm de diámetro, inerme, sin más órganos de fijación que cuatro ventosas que permiten la fijación del parásito a la mucosa intestinal.

Tiene un estróbilo de forma oval y alargada con los anillos más anchos que largos. A medida que se alejan del escólex, aumenta su tamaño aproximadamente hasta la parte media donde empiezan a disminuir adquiriendo así forma de hoja. Los proglotis tienen una morfología marcadamente craspédota por estar los proglotis unos imbricados en otros de tal forma que parecen encajar.

Anoplocephaloides mamillana conocida antes como *Paranoplocephala mamillana* (Melhis, 1831), mide 1,5 x 6 mm. Tiene un escólex pequeño y cuadrangular (700 µm de diámetro), provisto de cuatro ventosas poco salientes y de hendidura longitudinal. El estróbilo se ensancha rápidamente después del escólex alcanzando pronto su máxima anchura y conservando ésta hasta el final. Posee de 60 a 100 testículos, que se disponen en varias capas en el parénquima, en mitad del anillo opuesto al poro genital. Presenta una vesícula seminal externa y otra interna vive en el intestino delgado, aunque también se ha detectado en el estómago posiblemente, *post mortem causa est*.

2.1.3 Desarrollo y morfología de los huevos de Anoplocefálidos

Los huevos de los Anoplocefálidos se desarrollan en el útero de los proglotis grávidos.

Poseen tres cubiertas, una membrana vitelina externa; una capa media albuminosa; y una capa interna quitinosa piriforme que recibe el nombre de aparato piriforme, que aloja al embrión hexacanto u oncosfera. La morfología típica de estos huevos es en forma de “D”.

Los huevos tienen un tamaño variable, los de *A. perfoliata* miden 65-80 μm , los de *A. magna* miden 50-60 μm y los de *Anoplocephaloides mamillana*, 37-51 μm .

2.1.4 Morfología del cisticercoide

El cisticercoide es la larva de los Anoplocefálidos que se desarrolla en los hospedadores intermediarios que son los ácaros oribátidos.

Las primeras descripciones morfológicas de los cisticercoides datan de los años 40 cuando Bashkirova en 1941 realiza infecciones con huevos de *A. perfoliata* y distintas especies del género *Scherolibates* y describe las características morfológicas de los cisticercoides dos meses después de la infección de los ácaros.

El cisticercoide es una larva esférica con un apéndice caudal externo. Está recubierto por dos capas: una de tejido conjuntivo fibroso y otra interna muscular. En el interior se encuentra el escólex con un pequeño y cuello seis ganchos.

Su ultraestructura no ha sido estudiada en especies equinas pero puede extrapolarse de los estudios realizados en Anoplocefálidos del ganado ovino, concretamente en la especie *Moniezia expansa* (Caley, 1976). En estos se observan cuatro tipos celulares a las 15 y 28 semanas, por lo que la formación del cisticercoide en el interior del hospedador intermediario puede ser explicada como una transformación progresiva, de una estructura fibrosa en una celular.

Están formados por una capa externa o epidérmica que será reemplazada con el tiempo, por una capa amorfa electrodensa de naturaleza desconocida y una capa más interna, parecida a una estructura de mielina.

El escólex del cisticercoide morfológicamente tiene características parciales del cestodo adulto, es decir, posee cuatro ventosas, y se encuentra invaginado, variando el número de corpúsculos calcáreos que pueden ser observados en su interior entre 32 y 48 (Schuster y Coetzee, 2012).

2.1.5 Ciclo biológico de los Anoplocefálidos

Todos los Anoplocefálidos, poseen un ciclo biológico indirecto, es decir, necesitan un ácaro oribátido u hospedador intermediario que ingiere la oncosfera; y un hospedador definitivo en que se alcanza la madurez sexual y se cierra el ciclo biológico. En los oribátidos, en la cavidad celómica se desarrolla el cisticercoide que es la forma infectante para el hospedador definitivo, que se infecta al ingerir oribátidos con el alimento.

Hasta finales de los años 30 no se pudo establecer cuáles eran los hospedadores intermediarios de los Anoplocefálidos, aunque en investigaciones anteriores (Douthitt, 1915), ya se puso de manifiesto que los cestodos de la subfamilia *Anoplocephalinae* dependían de algún modo de los suelos fértiles y que se reproducían mejor en terrenos bajos y húmedos, indicando que los hospedadores intermediarios serían organismos que vivían en esas zonas.

La primera confirmación de la participación de los oribátidos como hospedadores intermediarios se hizo en ganado ovino identificándose los cisticercoides de *Moniezia expansa* en oribátidos del género *Galumna* infectados experimentalmente (Stunkard, 1937).

Por otra parte, no todos los oribátidos son igualmente válidos como hospedadores intermediarios (Kates y Runkel, 1948), por lo que se ha estudiado la relación entre los cestodos y sus posibles hospedadores intermediarios (Kates y Runkel, 1948; Rajski, 1959; Sengbusch, 1977; De Negri, 1991), pertenecientes al subfilo *Quelicerata*, Clase *Arachnida*, y Orden *Acariforme*.

No todos los oribátidos pueden actuar como hospedadores intermediarios en el ciclo biológico de los Anoplocefálidos en équidos. Se requiere que tengan un tamaño mínimo, para que puedan ingerir la oncosfera, previa destrucción mecánica de la cubierta externa del huevo (Caley, 1975) o por ingestión completa del huevo (Ebermann, 1976) para que se pueda desarrollar en su interior el cisticercoide (Bashkistrova, 1941).

El listado inicial de oribátidos que intervienen en el ciclo biológico de los cestodos, se ha ampliado a lo largo de los años, hasta un total de 127 especies pertenecientes a 27 familias (Balogh, 1972; De Negri, 1993). Una descripción más específica en la que se relacionan las especies de oribátidos y la correspondiente especie de Anoplocefálido puede encontrarse ya en 1981 listado por Borchert.

En resumen, como hospedadores intermediarios de *A. perfoliata* se han descrito las siguientes especies: *Scheloribates laevigatus*, *S. latipes*, *Galumna obvious*, *G. nervosus*, *G. dimorfica*, *Achipteria* sp, *Ceratozetes* sp, *Carabodes* sp, *Eremaeus oblongus*, *Hermanniella granulata*, *Liacarus* sp, *Liebsta diasimilis*, *Parachipteria punctata*, *Platynothrus peltifer*, *Trichoribates incisellus*; *Urabambates schachatachinskoi*, y *Zygoribatula microporosa*.

En el caso de *A. magna* las especies de oribátidos descritas son: *S. laevigatus*, *S. lapites*.

Por último, para *A. mamillana*, se han descrito las siguientes especies: *G. obvious*, *Allogalumna longiplumus*, *Scherolibates* sp, *Ceratozetes* sp, *G. eliminata*, *G. nervosus*.

Además de la descripción de nuevas especies de ácaros como hospedadores intermediarios, se ha demostrado que la distribución de géneros o familias de oribátidos presentes en una zona determinada, se infectan con diferente intensidad, siendo la prevalencia de parasitación mayor en *Scheloribates*, *Galumna*, *Achipteria* y *Ceratozetes* (Borchert, 1981; Narsapur, 1988).

En clara contradicción hay estudios posteriores que demuestran que tan solo dos géneros pueden albergar cisticercoides de estas especies como son: *Scherolibates* y *Amchipteria* (Andreeva et al., 1993).

Como características generales de los oribátidos, hay que señalar que son seres de vida libre, en ningún caso pueden ejercer como parásitos (Johnston, 1982), y su tamaño oscila entre las 200 y 1300 µm.

Aunque su distribución es cosmopolita, son más numerosos en las zonas en las que existen los factores abióticos adecuados: como la humedad elevada, temperatura moderada y suelos ricos en hongos, musgos, líquenes y materia orgánica en descomposición que son la base de su alimentación (Mitchell, 1979).

Viven generalmente a poca profundidad del suelo, en la capa más superficial (3-10 cm) y realizan migraciones, tanto verticales como horizontales, que dependen de factores climáticos (temperatura, humedad relativa, presencia de materia orgánica o compuestos del suelo). Las migraciones hacia las capas más superficiales se realizan a primeras horas del día y al atardecer.

El conocimiento de la biología y ecología de las distintas especies de ácaros oribátidos no es completo, a pesar de los amplios estudios realizados en distintos países europeos (Ghilarov y Knivolutsky, 1975; Subías y Gil-Martín, 1997).

La infección de estos hospedadores intermediarios se produce después de que los proglotis grávidos se desprendan, se liberen en el intestino y queden libres los huevos que salen con las heces al exterior.

En el suelo, los ácaros rompen la cubierta externa del huevo produciéndose la eclosión de la oncosfera; es decir, la salida del embrión hexacanto del interior del aparato piriforme. Atraviesa luego el intestino y al llegar a la cavidad celómica del ácaro se transforma a los 2-6 meses en cisticercoide en un plazo de dos a seis meses, aunque estos plazos son menores cuando la temperatura es más elevada. Según algunos autores el cisticercoide se transforma en unos cuatro meses en las especies *Scherolibates laevigatus* y *Scherolibates laticeps* (Boch y Supperer, 1988).

Estudios realizados en rumiantes demuestran que un ácaro puede desarrollar en su interior de uno a trece cisticercoides, y como los oribátidos pueden sobrevivir al invierno (Stoll, 1935), la contaminación de los pastos se mantiene hasta la primavera siguiente.

Los cisticercoides pueden sobrevivir en el interior del hospedador intermediario casi 22 meses, lo que hace las zonas con hospedadores intermediarios parasitados, sean potencialmente infectantes durante largos periodos de tiempo, incluso después de haber sido retirados del mismo los hospedadores definitivos (Mackiewicz, 1988).

A pesar de todas estas circunstancias, sólo un pequeño porcentaje de los oribátidos está infectado, estimándose su número entre el 3 y 6%, (Fritz, 1982; Schuster et al., 2000).

Los équidos se infectan cuando, al pastar, ingieren ácaros oribátidos parasitados con la hierba. En el interior del hospedador, el escólex del cisticercoide se evagina y se fija en la parte del tracto digestivo donde tiende a localizarse cada especie de Anoplocefálico. El periodo de prepatencia en los équidos oscila entre 2 y 4 meses a partir de la ingestión de ácaros infectados, siendo la vida media de estos parásitos en el interior del hospedador definitivo de unos tres meses.

2.2 Sobre la patogenia de los Anoplocefálicos

Existen diversos estudios sobre las alteraciones estructurales que causan los Anoplocefálicos equinos con objeto de relacionar los factores asociados a la patogenicidad de estos parásitos con la localización de cada especie. Así, la infección por *A. magna* y *A. mamillana*, que viven en la luz entérica sin producir lesiones aparentes en el epitelio intestinal, es claramente diferente de la causada por *A. perfoliata* que vive en el ciego, en el entorno de la válvula ileocecal.

Como la especie más frecuente es *A. perfoliata* (Lichtenfels, 1975; Dunn, 1978), la mayoría de los estudios realizados durante los últimos años se han centrado en intentar establecer una relación entre las alteraciones morfológicas y funcionales y las posibles manifestaciones clínicas.

Menos clara es la relación las manifestaciones clínicas de la infección producida por *A. magna* que se considera menos patógena que *A. perfoliata* aunque existen descripciones de rotura del duodeno en un équido (Oliver et al., 1977) en el que la única evidencia clínica fue la presencia de numerosos parásitos en la zona de rotura, sin que ello excluya otras causas posibles.

Otros estudios, tampoco concluyentes, relacionan la infección por *A. magna* con un cuadro de “abdomen agudo”, aunque los autores indican que esas manifestaciones pueden ser debidas también a otros agentes patógenos (Faleiros et al., 2000).

Los ejemplares de *Anoplocephala perfoliata* se localizan en el tercio distal del íleon, ciego y colon (Bain y Nelly., 1977; Fogarty et al., 1994; Nilsson et al., 1995), con tendencia a agruparse, lo que acrecienta las alteraciones patológicas, sobre todo en la válvula ileocecal (Fogarty et al., 1994) aunque con anterioridad hubo discrepancia en el cuanto al poder patógeno de esta especie. Algunos autores no encontraron relación alguna entre la presencia de *A. perfoliata* y las alteraciones observadas en el ciego y colon (Arundel et al., 1978); sin embargo, otros han indicado que este parásito podría causar hiperemia, ulceración y edema (Neveu-Lemaire, 1936).

Clásicamente, las alteraciones macroscópicas en la mucosa intestinal producidas por *A. perfoliata* son la inflamación de la mucosa en las zonas donde se fijan las ventosas (Dunn, 1978; Cosgrove et al., 1986; Edwards, 1986; Pearson et al., 1993; Yoshihara et al., 1994; Fogarty et al., 1994), edema (Soulsby, 1987, Arundel, 1985; Cosgrove et al., 1986; Fogarty et al., 1994), ulceración (Rees, 1967; Bain y Kelly, 1977; Dunn 1978; Bello et al., 1982; Soulsby, 1987; Arundel, 1985; Beroza et al., 1985; Cosgrove et al., 1986; Edwards, 1986; Klei, 1986; Owen et al., 1988; Pearson et al., 1993; Fogarty et al., 1994) excesivo tejido de granulación (Bain y Kelly, 1977; Barclay et al., 1982; Soulsby, 1987; Pearson et al., 1993; Fogarty, 1994) y enteritis catarral en las zonas de fijación del parásito (Soulsby, 1987). Las alteraciones histológicas descritas por otros autores se caracterizan por la existencia de abundante infiltrado celular destacando los eosinófilos, la presencia de membranas diftéricas y úlceras que pueden afectar en algunos casos a la muscular de la mucosa, las hemorragias en la mucosa y submucosa, fibrosis probablemente asociada a infecciones crónicas (Fogarty et al., 1994) e incluso áreas con necrosis (Fogarty et al., 1994; Ihler et al., 1995; Rodríguez-Bertos et al., 1999). Según otros, sólo hay hiperemia y úlceras en la

mucosa de los puntos de fijación de los cestodos, pero en ningún caso ese tejido de granulación (Bain y Nelly, 1977).

Además de la observación y descripción de alteraciones macro y microscópicas en los lugares de asentamiento de los parásitos, otros trabajos han tratado de conocer las consecuencias de la infección teniendo en cuenta la intensidad de la carga parasitaria. En este sentido, varios autores han concluido que existe correlación entre el número de cestodos y la gravedad de las lesiones (Fogarty et al., 1994; Nilsson et al., 1995; Williamson et al., 1997; Rodríguez-Bertos et al., 1999; Proudman y Trees., 1999; Lyons et al., 2006, Pavone et al., 2010).

En algunos de estos trabajos, se han realizado estudios en los que se definen los niveles de infección y se establecen varios tipos de lesiones, clasificados con puntuaciones que oscilan entre cero y tres. En ausencia de lesiones, la calificación es de cero, cuando existe un ligero engrosamiento e hiperemia de la mucosa cecal, se establece el grado 1. El grado 2 se asigna a las lesiones caracterizadas por un engrosamiento moderado de la mucosa cecal y úlceras necróticas aisladas; y, finalmente, el grado 3 se reserva a los casos en los que las lesiones son graves, con necrosis ulcerosa principalmente en la válvula ileocecal (Nilsson et al., 1995; Rodríguez-Bertos et al., 1999, Pavone et al., 2010).

El estudio histológico de las lesiones permite comprobar la existencia de infiltrados celulares formados principalmente por eosinófilos y linfocitos alrededor de las zonas ulceradas de la mucosa y de las membranas diftericas encontradas en la superficie mucosa del ciego, coincidiendo con las que habían sido descritas previamente (Bain y Kelly, 1977; Beroza et al., 1983, 1985; Pearson et al., 1993; Nilsson et al., 1995).

Otros estudios se han centrado en alteraciones histológicas producidas por *A. perfoliata* en plexos nerviosos entéricos, detectando la disminución de células neuronales del plexo mioentérico con un incremento en la cromatolisis con presencia de necrosis. Estos hallazgos sólo se han podido detectar en animales con cargas medias o elevadas (20 o más de 100 cestodos), aunque no se ha podido establecer una correlación entre las lesiones observadas y la tasa de parasitación (Pavone et al., 2010).

2.3 Sobre la clínica y patología de la anoplocefalosis

Como ya se ha indicado, el grado de patogenicidad varía de unas especies a otras derivado fundamentalmente de su localización y sus repercusiones sobre el hospedador. Las especies *A. mamillana* y *A. magna* no parecen ejercer una acción patógena que ocasione unos signos clínicos evidentes.

Sin embargo, la presencia de *A. perfoliata* se ha relacionado con lesiones intestinales severas y cuadros clínicos de tipo cólico (Proudman y Trees, 1999; Matthews et al., 2004). Efectivamente, desde las primeras descripciones de Bain y Kelly (1977) en caballos con una prevalencia muy elevada (>81%) y úlceras alrededor de la válvula ileocecal hasta la actualidad, en que se ha verificado la afectación de los plexos nerviosos de la zona (Pavone et al., 2010), hay cada vez más estudios que corroboran la importancia patogénica de esta especie para los équidos.

Las infecciones se han relacionado con importantes cambios funcionales en el intestino, como invaginaciones ileales, ileocecales, cecocecales y cecocólicas (Rodgers, 1966; Barclay et al., 1982; Lyons et al., 1984; Beroza et al., 1985; Cosgrove et al., 1986; Edwards, 1986; Owen et al., 1989; Biglietti y Garbagnati, 2000). También se han descrito peritonitis (Barclay et al., 1982; Beroza et al., 1983, 1985), torsiones cecales y de colon (Beroza et al., 1985) por disminución de la capacidad de distensión de la válvula ileocecal, considerando la presencia de *A. perfoliata* como determinante en la aparición del cuadro clínico. También se produce obstrucción intestinal que puede ser debida a la presencia de gran número de cestodos en la válvula ileocecal (Bello, 1979; Carmel, 1988).

La ausencia de correlación aparente, entre las infecciones por Anoplocefálidos y las manifestaciones clínicas, hizo que durante mucho tiempo la presencia de *A. perfoliata* fuera casi exclusivamente una curiosidad biológica hasta casi finalizado el siglo pasado, cuando Proudman et al., (1998) demostraron estadísticamente que la infección y la presentación de ciertos cuadros cólicos (cólico espasmódico e impactación ileal) estaban relacionados con elevadas cargas parasitarias de esta especie; hasta el 22% de los cólicos espasmódicos tenían una relación con la infección por *A. perfoliata* y hasta el 81% de los cuadros por impactación ileal, lo que permitió establecer que las elevadas cargas de *A. perfoliata* eran un factor de riesgo para este tipo de cólicos.

Respecto a este último punto, muchos autores habían relacionado la intensidad de parasitación a la clínica que podría manifestar un équido cuando alberga un elevado número de cestodos (Slocombe, 1979; Bello et al., 1982; Soulsby, 1987; Urquhart et al. 1996; Carmel, 1988; French y Chapman, 1992).

Sin embargo, en otros estudios no hay evidencias de la relación que existe entre la presencia de *A. perfoliata* y cuadros cólicos. En todos estos casos se utilizó para la detección de animales positivos la técnica inmunoenzimática ELISA (Trotz-Williams et al., 2008).

Lógicamente, algunos estudios epidemiológicos se han centrado en el conocimiento de los factores de riesgo (Cohen et al., 1995; Reeves y Salman, 1996), las épocas de presentación y de mayor prevalencia y otras circunstancias relacionadas con la mayor incidencia de cólicos en épocas determinadas del año (Proudman et al., 1997; Tinker et al., 1997; Hillyer et al., 2001).

Conviene tener en cuenta que, entre los helmintos parásitos de los équidos, los cestodos no son la única causa de la aparición de cólicos. Es preciso recordar la importancia de las larvas emigrantes de *S. vulgaris* que han sido las protagonistas durante mucho tiempo de los cólicos equinos (Duncan y Pirie, 1972) y sus consecuencias: alteraciones en la motilidad, arteritis, tromboembolismos, peritonitis, etcétera.

De igual manera, el actual conocimiento de las repercusiones de la infección por los ciatostominos ha dejado clara su participación en el desarrollo de invaginaciones cecocecales y cecocólicas (Mair et al., 2000) sin olvidar las consecuencias de las fases intestinales de *Parascaris equorum*, que se asocian a obstrucciones y roturas intestinales, peritonitis e invaginaciones (Southwood et al., 2002).

En este conjunto de trastornos digestivos, también hay que considerar la posibilidad de que la utilización de antihelmínticos pueda, en ocasiones, contribuir a que se presenten manifestaciones clínicas de “tipo cólico” como consecuencia de su acción sobre los parásitos (parálisis espástica) como se describe en la bibliografía (Southwood et al., 2002).

2.4 Prevalencia

En el estudio de la prevalencia de la infección por Anoplocefálidos en los équidos hay que tener en cuenta todos los factores relacionados con cada uno de los componentes de la triada epidemiológica; es decir, factores de los hospedadores intermediario y definitivo del parásito y del medio ambiente. Hay que indicar que especialmente en este grupo de parásitos el método de diagnóstico utilizado en los estudios ha sido determinante para explicar las grandes variaciones entre los distintos estudios.

De los métodos de diagnóstico in vivo, el más utilizado ha sido el análisis coprológico por diversas razones como la sencillez, la rapidez y la validez para detectar otros parásitos gastrointestinales de los équidos, aunque tienen una baja sensibilidad.

En la detección de endoparásitos digestivos equinos y de otras especies animales, se han utilizado de forma rutinaria distintas técnicas como la de Cornell-Wisconsin (Egwan y Slocombe, 1982) o la técnica McMaster (MAFF, 1986).

Después de la descripción en esas técnicas de la baja sensibilidad que tienen para detectar huevos de Anoplocefálidos en équidos (Proudman y Edwards, 1992; Nilsson et

al., 1995; Meana et al., 1998; Williamson et al., 1998; Rehbein et al., 2011), se han introducido modificaciones combinando métodos de flotación y sedimentación para aumentar la sensibilidad, aunque sólo se ha conseguido aumentar al 54% (Meana et al., 1998) o 61% (Proudman y Edwards, 1992).

Una reciente modificación de las técnicas rutinarias, basada en una doble centrifugación utilizando 5 o 15 gramos de heces y utilizando la sacarosa para la flotación de los huevos presentes en heces en lugar de solución salina saturada o sulfato de zinc, ha conseguido aumentar la sensibilidad en la detección de huevos de cestodos obtenida mediante modificaciones anteriores (Rehbein et al., 2011).

En los últimos años se han puesto a punto técnicas más sensibles como las inmunoenzimáticas (Proudman et al., 1997; Bohórquez et al., 2012) o moleculares (Drögemüller et al., 2004). A pesar de ello, algunos de estos métodos no son totalmente adecuados ya que puede haber falsos positivos (Abbot et al., 2008). Por su parte, se ha comprobado falta de especificidad (Kjær et al., 2007), aunque algunos trabajos recientes parecen haber eliminado esos inconvenientes (Bohórquez et al., 2012).

Todo ello hace que el mejor método de detección en la actualidad sea la observación post-mortem de los parásitos en los animales sospechosos.

Tienen también importancia algunos datos, como el tipo de animales (acceso a pasto o no), la época del año (más beneficiosa para los ácaros oribátidos) y, por supuesto, la técnica utilizada.

Desde el principio, los estudios estuvieron encaminados a conocer, entre otros aspectos, la prevalencia de las infecciones por Anoplocefálidos en distintos países, como Alemania (Stroh, 1923), Francia (Saliou, 1928), Panamá (Foster et al., 1937) o Rusia (Ershov, 1956).

Más recientemente, Slocombe (1979) estudió la prevalencia en el sur de Ontario (Canadá) detectando un 13,6% de los équidos parasitados (sin especificarla edad de los animales), solo por *A. perfoliata* con cargas parasitarias bajas, demostrando que la detección de huevos en heces aumentaba si se utilizaban métodos de análisis en los que se combinaba centrifugación y flotación.

En otras zonas de tradicional cría equina, como Kentucky, se han realizado numerosos estudios de prevalencia mediante análisis coprológico y necropsia (Lyons et al., 1983; Lyons et al., 1984; Lyons et al., 1985; Tolliver et al., 1987; Benton y Lyons, 1994; Lyons et al., 1997; Lyons et al., 2000; Lyons et al., 2006).

En alguno de los estudios de Lyons et al. (1983), se combina el diagnóstico *in vivo* (coprología con sulfato de zinc) y el diagnóstico post-mortem (recogida y recuento de

los cestodos obtenidos). Los autores sólo observaron *A. perfoliata* con una prevalencia del 53% mediante necropsia, mientras que los valores obtenidos por análisis coprológico fueron mucho menores (7%). Resultados incluso más bajos (4%) han sido tradicionales en otros estudios anteriores (Gawor, 1995).

Sin embargo, *A. magna* sólo aparece en potros de hasta un año de edad, principalmente en los meses de Octubre y Noviembre (Lyons et al., 1983).

En los años siguientes aparecen publicaciones que recogen estudios diversos y también revisiones de endoparásitos digestivos equinos en las décadas anteriores (1956 – 1983) mediante necropsias. Debe hacerse alusión a la denuncia de otros Anoplocefálidos, como *A. perfoliata* (17% de prevalencia) y *A. magna* (14%) (Tolliver et al., 1987).

Lyons et al. (1997) agruparon y compararon los resultados obtenidos desde el año 1989 al 1995, estudiando la transmisión de algunos endoparásitos equinos, como previamente habían hecho otros autores como (Reinemeyer et al., 1984; Torbert et al., 1986). Del análisis de los resultados pudieron concluir tanto un incremento en la aparición de *A. perfoliata* parasitando a los équidos, como un incremento en la intensidad de parasitación, encontrando a su vez distinta prevalencia de cestodos, dependiendo de la edad del hospedador.

Meana et al. (2005) detectaron que la presencia de cestodos es mayor en los meses de Diciembre y Noviembre para los dos grupos de animales que formaron parte del estudio.; es decir, en los meses más fríos del año.

Esta influencia de la época del año, en la prevalencia de estos parásitos y la mayor parasitación en los équidos en los meses fríos del año, ya había sido denunciada previamente (Lyons et al., 1983).

Además de los factores mencionados, hay que tener en cuenta los relacionados con el medio ambiente que influyen también en la actividad y otras particularidades de los hospedadores intermediarios. Por ejemplo, según Romero et al. (1989), se hace referencia a un aumento de la prevalencia de las infecciones en los caballos como consecuencia del incremento de las poblaciones de oribátidos en las praderas.

En esta dinámica cíclica, los datos coinciden con el incremento de las cargas parasitarias y, en consecuencia, de la excreción fecal de huevos y su ingestión por los hospedadores intermediarios que se traduce finalmente en un incremento de la probabilidad de que los équidos ingieran ácaros con cisticercoides (Romero et al., 1989).

Teniendo en cuenta esos resultados, Lyons et al. (1997), concluyen que la temperatura y la pluviosidad favorecen de forma marcada la reproducción de los ácaros aumentando considerablemente las poblaciones de intermediarios y los riesgos para los definitivos.

Los mismos autores, en estudios posteriores (Lyons et al., 2001) mediante necropsias en la zona central de Kentucky, confirman la misma prevalencia (52%) para *A. perfoliata* destacando en los meses de Enero, Junio y Agosto.

El número más elevado de cestodos en el hospedador fue detectado en los animales de mayor edad, algo que ya había sido descrito en estudios realizados anteriormente, atribuyendo este hecho a que posiblemente el número de hospedadores intermediarios en el medio ambiente era suficiente, lo que unido a la elevada intensidad de parasitación, permitió la contaminación del medio ambiente con huevos de Anoplocefálidos excretados con las heces tras desprenderse los anillos grávidos de los cestodos (Lyons et al., 2006).

En áreas geográficas diametralmente opuestas – como en Perth (Australia) –, se ha comprobado mediante necropsias una prevalencia de las infecciones por *A. perfoliata* del 4,9% (Dunsmore et al., 1985). Según esos estudios, la mayoría de los animales parasitados tenían más de tres años; en otras regiones otros autores también observan mayor prevalencia en los adultos (Lyons et al., 2006) aunque existen publicaciones en las que se hace referencia a una mayor prevalencia en los jóvenes (Ershov, 1956; Fukui, 1960; Dunn, 1978; Bello, 1979; Reinemeyer, 1984).

En cuanto a las especies parásitas identificadas, *A. perfoliata* fue la única encontrada pero en el mismo estudio de Dunsmore et al. (1985) se indica que también se detectó *A. mamillana* en un animal parasitado. Esa cita podría ser accidental porque en otros estudios posteriores realizados en Australia sólo se ha detectado *A. perfoliata* (Boxell et al., 2004) con una prevalencia del 10,3% de los caballos estudiados; en Queensland, las cifras son superiores (32% de prevalencia de *A. perfoliata* mediante necropsias (Mifitilodze et al., 1989).

Los valores de prevalencia son bastante variables. En el estudio realizado en Perth, el 4,3% de los caballos estudiados estaba parasitado; en Queensland, las cifras son superiores (32% de prevalencia de *A. perfoliata* mediante necropsias).

Otro dato de interés en estos estudios es la relación entre el grado y la intensidad de las infecciones. En casi todos los trabajos, se indica que la intensidad de la parasitación por *A. perfoliata* es una intensidad media, siendo ligeramente más baja que la que se detectó hace años en estudios realizados en Nueva Zelanda (Bain et al., 1977). Para *A. magna* la intensidad fue baja.

Otros estudios demuestran prevalencias elevadas. Por ejemplo, en Clwyd (Gales), Owen et al. (1988) han obtenido tasas de prevalencia de infecciones por *A. perfoliata* fue del 69% mediante necropsias si bien los valores fueron diferentes al comparar los datos obtenidos en caballos y ponies. Lo mismo que señalan otros autores, también en este caso, los animales de mayor edad son los que presentan tanto mayores porcentajes de infección como las mayores cargas parasitarias. Y en cuanto a la estacionalidad, las infecciones son más elevadas en los meses de invierno, como otros autores han señalado también (Bain et al., 1977, Hass, 1979; Lyons et al., 1984).

Sin embargo, Forgarty et al. (1994) indican que en Irlanda la prevalencia de *A. perfoliata* según resultados de necropsias realizadas entre Mayo y Septiembre llega al 51%.

Valores más o menos parecidos se han obtenido en estudios realizados en Tokio (Yoshihara et al., 1994), en los que la única especie encontrada fue *A. perfoliata* con una prevalencia del 33,1%. Estos autores indican que existen diferencias entre los resultados obtenidos según la época del año, con porcentajes más elevados en los meses de primavera, otoño e invierno. En cuanto al número de vermes, la mitad de los animales estudiados tenían cargas bajas (1-10 parásitos/animal); y en relación con la edad, los menores de tres años tenían un 15% más de vermes que los adultos (Yoshihara et al., 1994).

En Suecia (Nilsson et al., 1995), *A. perfoliata* se detectó mediante necropsias en el 65% de los animales estudiados, sin encontrar diferencias significativas entre ésta y la edad o el sexo de los animales. El número de parásitos presentes en más del 50% de los animales estudiados, fue muy variable: entre uno a cien cestodos.

A la vez, se hizo una comparación con los resultados de análisis coprológicos mediante centrifugación-flotación para detectar huevos sin que se haya podido relacionar el número de cestodos adultos y el número de huevos en las heces, lo que concuerda con los estudios de Proudman y Edwards (1992). De hecho los autores destacan que en algunos casos se encontraron huevos en muestras procesadas con tres gramos de heces y no con treinta, que podría ser explicado como a una excreción esporádica de proglotis grávidos de los cestodos que se desintegran antes de ser excretados.

No parece existir inmunidad adquirida con la edad ni resistencia a la infección por *A. perfoliata*. En este sentido, se encuentra una densidad relativa (total de cestodos encontrados dividido entre el número de caballos examinados) menor en animales jóvenes (Nilsson et al., 1995).

En Polonia Gawor (1995) la prevalencia de *A. perfoliata* y *A. magna* no fue elevada, tan sólo el 4% de los animales resultaron estar parasitados por alguno de estos cestodos,

valor similar al encontrado para *A. perfoliata* en estudios anteriores (Pecheur et al., 1979). El número de ejemplares adultos de *A. perfoliata* fue algo superior, oscilando entre 48 y 74 cestodos frente al único cestodo encontrado de *A. magna*. Esta prevalencia es similar a otros países europeos, los trabajos de Barus (1962), Pecheur et al. (1979), y Kazlauskas (1958) realizados en la República Checa, Bélgica y Lituania, muestran valores también bajos: 1% para *A. perfoliata*; 5,3%; o el 8,7% (*A. magna*), respectivamente.

Estudios en caballos salvajes primitivos (*Equus caballus gmelini*) que viven en la reserva forestal de Popielno realizados en Polonia (Slivinska et al., 2009), muestran una prevalencia del 72,7% por *A. perfoliata* aunque las cargas parasitarias son bajas. Resultados parecidos obtuvieron los mismos autores en Ucrania (Slivinska et al., 2006).

En el norte de Europa, concretamente en dos regiones de Noruega, Ihler et al., (1995) mediante necropsias han encontrado prevalencias de entre el 7% y el 27%, pero las diferencias en cuanto a la edad, sexo o raza de los animales no fueron significativas.

Porcentajes semejantes se han obtenido en otros estudios europeos. Por ejemplo, en Holanda, Borgsteede et al. (1996) han obtenido valores de infecciones por Anoplocefálidos del 23% primordialmente por *A. perfoliata*, aunque también se han detectado infecciones por *A. mamillana*.

El tipo de vida de los animales influye lógicamente en la posibilidad de infecciones por parásitos de ciclo indirecto, como los Anoplocefálidos y, en consecuencia, en la prevalencia observada. Estudiando la parasitación por este grupo parasitario en animales estabulados y en régimen extensivo de explotación, Papazahariadou et al. (2009) en Grecia han comprobado mediante coprología que las infecciones por *A. perfoliata* son mucho más frecuentes en los animales que pastan que en los estabulados, en los cuales es difícil encontrar animales positivos aunque la sensibilidad de los métodos coprológicos hace que la interpretación de los resultados deba ser cautelosa. Los resultados obtenidos en otros países, como Turquía, por Umur et al. (2009) que obtienen valores muy bajos (1,2% para *A. perfoliata*) mediante coprología podría interpretarse de la misma manera,

En este mismo sentido hay que comentar los resultados de estudios de prevalencia de la infección por Anoplocefálidos entre la población asnal en Etiopía. Mediante necropsias, se han detectado *A. perfoliata*, *A. magna* y *A. mamillana*, pero mediante coprología (McMaster) no pudo demostrarse su presencia (Getachew et al., 2010) a pesar de que mediante serología, estudios previos de los mismos autores demostraron una elevada tasa de infección (Getachew et al., 2006).

En Brasil, se conoce la presencia de *A. perfoliata* desde hace muchos años (Travassos, 1919; Lanfredi 1983; Barbosa, 1995; Pereira et al., 2006); la prevalencia de las infecciones según estudios más recientes, es muy variable oscilando entre el 28,6% (Barbosa, 1995), el 85% (Pereira et al., 2006) o el 90% (Lanfredi, 1983), según regiones.

2.5 Sobre el control de la enfermedad: Diagnóstico, Tratamiento y Profilaxis

Hay muy pocos productos comercializados en España capaces de eliminar estos parásitos en los caballos. Desde hace años se han introducido en los programas de control antiparasitario fármacos de acción cestodicida para evitar infecciones graves y sus consecuencias reduciendo la posibilidad de presentación de cólicos.

La mayoría de los antihelmínticos que se utilizan en el control antiparasitario carecen de acción frente a los cestodos. Sólo algunos tienen eficacia frente a los vermes adultos, requiriendo a veces dosis elevadas para conseguir un cierto control.

Actualmente existen fármacos de gran eficacia, como el pamoato de pirantel a la dosis doble de 6,6 mg/ Kg (Slocombe, 1979 y 1995; Lyons et al., 1986; Höglund et al., 1998). Sin embargo, en la actualidad hay otros productos que pueden administrarse en una única dosis de pamoato de pirantel, que se ha registrado desde hace muchos años, tiene un buen margen terapéutico y no tiene apenas riesgos para los caballos (Marchiondo et al; 2006).

Otro principio activo disponible de buena eficacia para los cestodos de los caballos es el praziquantel a dosis de 1 o 2 mg/Kg (Slocombe, 1979; Lyons et al., 1986) que se presenta en diferentes formulaciones y presentaciones desde inyectables a la dosis de 0,5mg/Kg (Lyons et al., 1995) a pasta oral al 9%, siendo la dosis de praziquantel administrada al animal de 1mg/ Kg de peso vivo (Owen et al., 2007). Hay muchos estudios que demuestran la eficacia de praziquantel frente *A. perfoliata* (Blond-Riou, 2003; Cleale et al., 2003; Coles et al., 2003; Longhofer, 2003; Lyons et al., 1992, 1995, 1998; Marley et al., 2004). Es un antihelmíntico que tiene un amplio margen de seguridad. No se han observado efectos secundarios ni en sementales ni en yeguas preñadas, ni en potros a partir de los dos meses de edad, por lo que su utilización es muy segura.

Este fármaco está registrado para los équidos en combinación con otros antiparasitarios como la ivermectina o la moxidectina. A la dosis recomendada ha demostrado su eficacia cestodicida en distintos países europeos y latinoamericanos (Coles et al., 2001; Villard et al., 2001; Frayssinet et al., 2001; Mercier et al., 2001; Marley et al., 2004) con eficacias elevadas tanto en combinación con ivermectina (Getachew et al., 2013) o moxidectina (Grubbs et al., 2003).

Otros principios activos eficaces frente a *A. perfoliata* son el tartrato de pirantel a razón de 2,6mg/Kg (Greiner y Lane, 1994) o el emboato de pirantel, a la dosis de 38mg/Kg (Benton y Lyons, 1994).

También se ha verificado la eficacia de la nitazoxanida 100mg/Kg, con efectos cestodidas y nematocidas en humanos, observándose reducción del número de animales positivos por coprología al inicio del estudio tras este tratamiento antiparasitario (Craig et al., 2003).

Han pasado ya a la historia de la farmacopea algunos principios activos como el diclorofeno (180mg/Kg), la niclosamida (100Kg/Kg) o el bitionol (5-10mg/Kg) aunque son cestodidas eficaces (Toguchi et al., 2004).

La administración de antiparasitarios no es la única actuación que podemos realizar para controlar los cestodos. De hecho, el control del medio ambiente es esencial para disminuir su contaminación y reducir las poblaciones de oribátidos. Como medidas de profilaxis y control medioambiental cabe destacar la retirada periódica de las heces de las praderas para romper el ciclo biológico no sólo de los Anoplocefálidos sino de la mayoría de los parásitos. De esa forma se reduce el número de huevos disponibles para los ácaros y, a largo plazo, también se reduce el riesgo de infección de los caballos. Es una medida muy frecuente en algunos países, como Gran Bretaña en donde se suelen retirar las heces de los paddocks dos veces por semana de media. Esta medida, a pesar de su gran eficacia, es poco factible en pastos comunales, yeguas con un gran número de animales, en praderas de gran extensión o lugares de difícil accesibilidad.

Para disminuir la parasitación equina por Anoplocefálidos también se han propuesto otras medidas como el pastoreo alternante con otras especies animales, como los bovinos (Bello, 1982).

3.MATERIAL Y MÉTODOS



3.1 Estudios en el hospedador definitivo

3.1.1 Material *post mortem*

Entre los años 2001 y 2011, se realizó el estudio de un total de 780 paquetes digestivos, procedentes de los mataderos de León (314), Segovia (107), Barcelona (108) y Guadalajara (203) (Tablas 1 y 2). La selección de los mataderos se realizó debido a que ofrecían garantías de un número mínimo de animales sacrificados para poder realizar nuestros estudios. Del total de digestivos, se procedió a la apertura completa del intestino delgado en 693; y de 87, sólo se realizó la apertura del ciego confirmando sólo la presencia o ausencia de parasitación por *Anoplocephala perfoliata*, por imposición del matadero.

En las tablas no se incluyen 48 animales cuya necropsia se realizó en Cádiz (n=4), Sevilla (n=43) y un équido procedente del Hospital Clínico Veterinario (HCV) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

El material recogido se utilizó para realizar diferentes estudios, que más adelante describiremos.

El correspondiente a los años 2001-2003 (en total 451 animales) se utilizó principalmente para conocer la dinámica poblacional y prevalencia de las infecciones por las distintas especies de cestodos.

El estudio con el material obtenido entre los años 2005 y 2007 sirvió, además de para ratificar los resultados obtenidos en el primer periodo (2001-2003), para comprobar la influencia de la edad de los hospedadores en la infección.

Por su parte, en los años 2008 al 2011, el material obtenido se utilizó para conocer la supervivencia de los huevos de los Anoplocefálidos y proceder a la realización de infecciones experimentales de los hospedadores intermediarios.

En las siguientes tablas se recoge el número de digestivos analizados mensualmente durante los años en los que fue realizado el estudio y la distribución regional y anual del material analizado.

Tabla 1. Años de estudio y número de animales muestreados por mes

Años	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
2001-2003	42	29	10	14	13	55	56	10	92	64	48	23
2004-2006	15	10	27	29	8	16	4	14	16	24	21	6
2007-2011	5	35	28	21	9	2	0	0	0	0	12	0

Tabla 2. Procedencia de los animales muestreados por año de estudio

Matadero	2001-2003	2004-2007	2008-2011
León	145	94	93
Segovia	11	88	22
Guadalajara	195	8	0
Barcelona	108	0	0

3.1.2 Material *in vivo*

En el año 2006 se recogieron muestras de heces directamente del recto de 100 animales de la provincia de León, en tres tipos diferentes de explotaciones: una explotación extensiva, otra intensiva en la que los animales estaban destinados a la producción cárnica; y una tercera que era un picadero en el que los animales estaban estabulados (Tabla 3).

Tabla 3. Nº total de muestras analizadas y tipo de explotación

Número muestras	Tipo de explotación
45	Extensiva
15	Picadero
40	Intensiva

Por otra parte, entre los años 2006 y 2008, se analizaron un total de 151 sueros procedentes de dos regiones en las que no existía posibilidad de realizar un estudio *post mortem* por la ausencia de matadero, y 40 sueros de animales de la provincia de León. En la Tabla 4 se detalla el número de yeguas analizadas así como el número total de muestras recogidas.

Tabla 4. Nº de yeguas y muestras recogidas de cada región

Región	Nº yeguas	Nº muestras
Madrid	3	37
Andalucía	6	114
León	1	40

3.1.3 Metodología

3.1.3.1 Recogida y procesado de vísceras

De los 451 tractos digestivos procedentes de los mataderos de León, Guadalajara y Barcelona analizados durante los años 2001 a 2003, se recogieron los cestodos encontrados durante la necropsia de cada digestivo y se introdujeron en botes con agua destilada o PBS para su recuento posterior e identificación en el laboratorio. En todos los casos, se realizó la apertura del ciego donde se aloja la especie *A. perfoliata* pero tan sólo en 343 digestivos se realizó la apertura completa de intestino delgado en busca de la especie *A. magna*.

Los digestivos procedentes de León se analizaron en la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de León, mientras que los de Guadalajara se abrieron en la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid.

Los digestivos procedentes del matadero de Barcelona, se procesaron en el propio matadero.

En las Tablas 5 y 6, se recogen los datos correspondientes al número total de digestivos mensualmente recogidos por año y al número total de tractos digestivos procedentes de cada uno de los mataderos por año.

Tabla 5. Nº de tractos digestivos por año y mes

Año	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
2001											11	3
2002	11	9	6	9	10	9	11*	8	11	11	20	9
2003	31	20	4	15	3	38	53	2	80	40	12	10

El número total de muestras fue 446, aunque no se contabilizan cinco digestivos procedentes del matadero de Segovia en Octubre del año 2002.

Tabla 6. Nº de tractos digestivos procedentes de cada matadero y año de recogida

Localización matadero			
Año	Guadalajara	León	Barcelona
2001	14	0	0
2002	124	92	108
2003	59	49	0

3.1.2.1.1 Estudio de la intensidad de parasitación por Anoplocefálidos y grado de desarrollo

Tras la recogida de los cestodos en cada órgano se realizó el recuento e identificación morfológica. Para conocer el grado de desarrollo se prepararon de la siguiente forma. Los cestodos recogidos previa colocación de los ejemplares en placas de triquineloscopia sumergidas en formol al 10%, durante 24 horas con objeto de que conseguir su correcta colocación y disposición. Después se procedió a la introducción en una batería de alcoholes (desde alcohol 99% hasta alcohol 70%), se hizo la tinción con carmín clorhídrico y, finalmente, se montaron con Bálsamo de Canadá, antes de su identificación y clasificación.

Los cestodos incluidos para conocer su desarrollo estaban en el intestino delgado y fueron de la especie *A. magna* o en ciego y válvula ileocecal siendo de la especie *A. perfoliata*; en ambos casos, su identificación se había realizado teniendo en cuenta sus

características morfológicas, por la presencia o ausencia de solapas ventrales propias de la especie *A. perfoliata*.

Se estudiaron en total de 1402 cestodos de la especie *A. perfoliata* y 333 de *A. magna*.

Sobre la base de las estructuras presentes en el interior de los proglotis, los cestodos de la especie *A. perfoliata*, se clasificaron como: cestodos inmaduros en los que no se observaba ninguna estructura en el proglotis; cestodos maduros, en los que se apreciaban los órganos sexuales tanto masculinos como femeninos; y cestodos grávidos en los que los últimos proglotis tenían el útero repleto de huevos.

Los ejemplares de *A. magna*, se clasificaron en dos grupos: cestodos grávidos y no grávidos, teniendo en cuenta si los últimos anillos estaban o no grávidos.

Se calculó tanto la prevalencia global como la prevalencia mensual para las dos especies de Anoplocefálidos detectadas durante la realización de este estudio.

3.1.2.1.2 Estudio de la influencia de la edad del hospedador parasitado

Este estudio se realizó a lo largo de quince meses, desde el año 2006 hasta el año 2007, periodo en el que fueron muestreados animales sacrificados y/o necropsiados en León, Segovia y Madrid.

Para los muestreos de León, se realizaron 22 traslados al matadero municipal de la ciudad. En cuanto a Segovia, también se muestrearon équidos sacrificados en el matadero; y los estudiados en Madrid corresponden a animales sacrificados en el Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de Madrid (HCV).

Siempre que era posible, se verificaban, en el lugar de origen, las guías sanitarias y se comprobaba la edad de los animales. Para nuestros fines, hemos distribuido a los animales incluidos en el estudio en dos grupos: potros y adultos. Se han considerado potros a todos los animales menores de dos años; y adultos a los que tenían más de esa edad. En la Tabla 7, se recogen los datos de los animales estudiados.

Tabla 7. Procedencia de tractos digestivos y edad animal

Procedencia de las muestras	Animales muestreados de edad conocida		Animales de edad desconocida	Total
	adulto	potro		
León (matadero municipal)	32	57	14	103
Segovia (matadero municipal)	17	12	21	50
Madrid (HCV de la UCM)	4	0	0	4

Los datos correspondientes al número de animales muestreados en cada una de las estaciones del año, se reflejan en la Tabla 8

Tabla 8. Nº de animales muestreados por época del año y edad

Estación	Potros	Adultos	Sin datos	Total
Otoño	18	17	14	49
Invierno	17	14	11	42
Primavera	16	11	7	34
Verano	18	11	3	32
Total	69	53	35	157
	122			

En cuanto a las muestras procedentes del matadero de Segovia y las del HCV de la UCM, el paquete gastrointestinal se procesó en la sala de necropsias de la Facultad de Veterinaria de Madrid; los de León, se procesaron *in situ*. En todos los casos, inicialmente se procedió a la apertura del estómago intestino completo y a la observación macroscópica de la mucosa y del contenido gastrointestinal.

Los cestodos presentes se recogieron y almacenaron para su posterior identificación y cuantificación.

3.1.3.2 Recogida y procesado de heces

Para el estudio de las muestras de heces se utilizó la técnica coprológica descrita por Meana et al. (1998).

3.1.3.3 Recogida y procesado de sangre

La sangre se obtuvo de la vena yugular y se almacenó en tubos sin anticoagulante para poder extraer el suero. Todas las muestras se mantuvieron inicialmente a temperatura ambiente hasta que se produjo el coágulo; después se procedió a extraer el suero que fue almacenado previa identificación individual en microtubos, en congelación moderada, a menos 20°C.

El número total de sueros, que se procesaron siguiendo el método de Proudman y Edward (1998) fue de 191.

3.1.3.4 Recogida y procesado de lesiones

De los 451 tractos digestivos que se estudiaron entre 2001 y 2003, se recogió la válvula ileocecal de 80; posteriormente se procedió a la fijación en formol al 10% para y su posterior procesado según técnicas rutinarias de histología.

De las 80 muestras tomadas 51 pertenecían a tractos digestivos de équidos en los que se encontró *A. perfoliata* en la válvula ileocecal.

En la tabla 9 se especifica el número de paquetes digestivos procedentes de cada matadero y el mes del año en el que se recogieron las muestras.

Tabla 9. Nº de paquetes digestivos recogidos mensualmente y procedencia

Matadero	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero
Barcelona	4	1	0	2	0	0	0	0
Guadalajara	1	1	0	0	10	2	4	1
León	3	2	0	3	14	0	4	3

En el año 2006 se realizó un segundo estudio de las lesiones producidas por la presencia y fijación de *A. perfoliata* en 35 équidos sacrificados en los mataderos de León y Segovia, utilizando la técnica de necropsia. La edad de los animales se pudo conocer gracias a las

tarjetas de identificación de cada animal y se establecieron dos grupos: animales menores de dos años o potros y adultos mayores de dos años.

Tras hacer la incisión desde el estómago hasta el recto, se recogieron los parásitos presentes y se fijaron inmediatamente después. En los animales que estaban parasitados por *A. perfoliata* se recogió la válvula ileocecal, se fijó en formol al 10% y se estudió finalmente mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

El método de estudio de la válvula ileocecal consistió en realizar secciones que fueron sumergidas en parafina para hacer cortes histológicos que finalmente se tiñeron con hematoxilina eosina y tricrómico de Masson.

Las lesiones se clasificaron de nuevo en tres grupos de acuerdo con los cambios observados, de acuerdo con las recomendaciones y la clasificación de Rodríguez Bertos et al. (1999). Muestras de ocho válvulas ileocecales se procesaron para su estudio mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica, en concreto la técnica de NADPH-diaforasa (NPD) y la técnica para el revelado de la enzima de síntesis neural del óxido nítrico (NOSn).

Las muestras seleccionadas para el análisis histopatológico, eran sumergidas inmediatamente en una solución de fijación consistente en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1M a pH 7,4, donde permanecían por espacio de 2-3 horas.

Una vez finalizada la fijación, las muestras se cambiaban a una solución de sacarosa al 30% en tampón fosfato 0,1M, a pH 7,4 y a 4°C en refrigeración para su criopreservación. El paso previo a la realización del corte y procesamiento de los tejidos fue su congelación y almacenamiento. Para la congelación, se utilizaba nieve carbónica con la que se cubría completamente el tejido por espacio de unos minutos, obteniendo una congelación uniforme y muy rápida. Seguidamente, cada porción era envuelta en papel de aluminio, convenientemente identificada, y guardada en cajas de plástico en congelación a -80°C.

Las secciones del tejido a analizar se obtuvieron utilizando un microtomo de congelación con un generador de frío acoplado. El bloque se adhería a la platina del microtomo gracias a un medio especial, el *Tissue-Teck*®, que actúa como un pegamento sobre la superficie congelada. La platina se congelaba a -25°C, y el tejido era rodeado además, con nieve carbónica en polvo.

3.2 Estudios en el hospedador intermediario

3.2.1 Material

Se recogieron durante un año desde septiembre de 2010 a agosto de 2011, muestras de tierra obteniéndose un total de 51.022 ácaros oribátidos.

Las muestras se tomaron de la yeguada Haras de Ulzama, situada en la provincia de Navarra (Latitud: 43.0244; Longitud: -1.6566) en la que la infección de équidos por cestodos había ocasionado problemas clínicos y la muerte de un animal, cuya necropsia confirmó la participación de *Anoplocephala perfoliata*.

3.2.2 Recogida y procesado: técnica de Berlese



Fotografía 1. Dispositivo de Berlese para la obtención de oribátidos

El método de muestreo consistió en la toma de tierra de forma mensual de ocho zonas de la yeguada a una profundidad de unos 15-20 cm recogiendo aproximadamente la tierra que se encuentra en un espacio de unos 30 cm x 30 cm. Las muestras se obtuvieron siempre a primera hora de la mañana, ya que está demostrado que los ácaros son más activos durante las primeras horas de la mañana y a última de la tarde

en capas más superficiales. Posteriormente, se colocaron en bolsas y cada muestra fue correctamente identificada y enviada al laboratorio.

Una vez en el laboratorio, las muestras se pesaron para obtener el peso fresco, y después se realizó la técnica de Berlese para la extracción de los oribátidos (Fotografía 1). Las muestras de tierra se mantuvieron en los embudos hasta que no se obtuvieron ácaros; el día de su retirada se pesaron nuevamente para obtener el peso seco de cada una de las muestras.

3.2.2.1 Descripción de la técnica de Berlese

La técnica de Berlese consiste en colocar la muestra en embudos con una malla de suficiente diámetro de poro en la parte inferior para permitir que los ácaros pasen a través de ella. En la parte superior, se coloca una lámpara de 60W que se mantiene permanentemente conectada durante el tiempo de extracción de ácaros de la muestra; en la parte inferior se coloca un recipiente, bien con agua, bien con alcohol 70° para la recogida de los ácaros. Como los oribátidos son fotofóbicos y necesitan humedad, descienden hacia capas más profundas de la muestra en busca de la humedad necesaria acumulándose en los recipientes dispuestos convenientemente.

Una vez obtenidos los oribátidos, al menos 100 de los recogidos en cada una de las muestras se introdujeron en ácido láctico para aclararlos y poder reconocer al microscopio óptico las distintas estructuras que permiten su identificación.

Para la identificación de los ácaros oribátidos, tanto los 100 que se recogen para la identificación por muestra de tierra y mes del año como los recogidos después de la infección experimental, se utilizan unas claves de identificación de Subías (comunicación personal).

En el laboratorio y mediante el uso de un estereomicroscopio, se colocó el líquido obtenido de los recipientes de cada uno de los embudos en una placa de Petri para la extracción y recogida de los ácaros mediante el uso de una aguja entomológica. Una vez realizado el recuento, se almacenaron en alcohol 70° hasta su identificación posterior. Excepto 18.797 ácaros oribátidos obtenidos entre los meses de Septiembre a Febrero de 2010-2011, que fueron depositados después de recogerse utilizando la técnica de Berlese en medios de cultivo para realizar infecciones experimentales en los mismos. El número de ácaros recogidos en las distintas zonas durante el periodo de muestreo se detalla en la Tabla 10.

Tabla 10. Número de oribátidos obtenidos de cada una de las zonas de toma de tierra y porcentaje del total de oribátidos recogidos mensualmente

	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto
Nº ZONAS	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Nº TOTAL	3861	9871	3220	5489	3798	3721	3825	3582	3421	1907	2657	5670
ZONA 1	91	831	470	883	125	268	798	383	541	147	81	46
ZONA 2	351	817	581	614	689	772	432	520	370	79	62	122
ZONA 3	715	917	524	540	81	932	449	156	350	101	122	99
ZONA 4	725	1088	773	506	108	211	631	252	252	75	618	57
ZONA 5	486	459	77	1573	143	236	515	661	210	431	390	1168
ZONA 6	310	2215	108	558	1412	469	49	335	254	203	65	1863
ZONA 7	319	1217	154	252	174	269	638	876	820	305	435	1173
ZONA 8	864	2327	533	563	1066	564	313	399	624	566	884	1142
% MES/TOTAL	7,57	19,35	6,31	10,76	7,44	7,29	7,50	7,02	6,70	3,74	5,21	11,11

Para la infección de los ácaros oribátidos la recogida de los ácaros fue realizada utilizando la misma técnica descrita que para su identificación, pero en lugar de almacenarlos en alcohol 70° se depositaron en medios de cultivo específicos para los oribátidos.

Durante los meses de Septiembre de 2010 a Febrero de 2011, una vez recogidos más de 100 ácaros que se utilizaban para su identificación, el resto se recogieron vivos y se extrajeron del agua colocada en la parte inferior del método Berlese, en menos de 24 horas y fueron depositados en medios de cultivo específicos para estos ácaros.

Se realizaron un total de 53 cultivos en los que el número de ácaros osciló entre 50-740, aunque en un total en 28 de estos cultivos el número fue de unos 400 ácaros oribátidos por medio.

El total de oribátidos utilizados para las infecciones experimentales fue de 19.176.

3.2.3.2 Descripción de los medios de cultivo de ácaros oribátidos en condiciones de laboratorio

En el medio de Narsapur se añaden pequeñas tira de patata cada quince días; en nuestro caso, realizamos un cambio utilizando pequeñas tiras de papel de filtro mojado con levadura en polvo porque con la patata aparecían gran cantidad de hongos.

Se esterilizó la tierra y las heces a una presión de 1.032 bares durante un tiempo de 15 minutos. Tras esta esterilización se colocó en una cubeta de 6 x 6 x 6 recubierta con papel de filtro una mezcla de 200 gramos de tierra y heces, en una proporción de los componentes del 50%.

Para evitar la salida de los ácaros del medio de cultivo, en la parte superior del recipiente se colocaron mallas de 20 µm de poro que permitían la circulación de aire, pero no la salida de los oribátidos. Todos los días los medios de cultivo se revisaban para colocar de nuevo en la tierra aquellos oribátidos que subían a la zona superior de los recipientes utilizados.

Una vez obtenido el medio, esta mezcla se mantuvo con humedad elevada entre el 70-80% en todos los casos, en oscuridad y añadiendo pequeñas cantidades de agua destilada dependiendo de la humedad observada en la tierra, siempre en días alternos.

3.2.3 Infección del hospedador intermediario

3.2.3.1 Infección natural

Para comprobar la infección natural de oribátidos en el medio ambiente de los recogidos durante todos los meses y mantenidos en alcohol 70°, fueron recuperados 500 por mes entre las ocho zonas muestreadas e identificados con las claves de Subías (comunicación personal). Con estas doce muestras se realizó una PCR triple (Meana, 2013), para poder saber si ya estaban infectados de forma natural.

Por otra parte se calculó el 5% de oribátidos del total obtenidos por mes de muestreo. Este ensayo fue llevado a cabo después de la identificación de las familias, agrupando

las muestras para obtener este porcentaje de las zonas 1 a 4 y de las zonas 4 a 8. Como se muestra en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11. Nº de oribátidos de cada familia de las zonas 1 a 4 recogidos mensualmente

Zonas 1-2-3-4 Mes	Nº Scheloribatidae	Nº Oribatulidae	Nº Mochlozetidae	Nº Galumnidae	Nº Ceratozetidae	Nº Hemileiidae
Septiembre	66	26	0	0	0	0
Octubre	117	50	12	0	0	0
Noviembre	54	48	13	0	0	0
Diciembre	63	59	4	4	0	0
Enero	21	22	6	0	0	0
Febrero	91	6	5	5	6	0
Marzo	82	30	2	0	0	0
Abril	36	27	0	0	0	0
Mayo	33	33	6	0	0	0
Junio	0	8	6	0	0	0
Julio	8	0	5	0	0	30
Agosto	1	11	2	0	0	0

Tabla 12. Nº de oribátidos recogidos de las zonas 5 a 8 mensualmente

Zonas 4-5- 6-7-8 Mes	Nº Scheloribatidae	Nº Oribatulidae	Nº Mochlozetidae	Nº Galumnidae	Nº Ceratozetidae	Nº Hemileiidae
Septiembre	66	29	2	0	0	0
Octubre	111	200	0	0	0	0
Noviembre	22	19	0	0	0	0
Diciembre	43	29	0	5	0	0
Enero	60	79	0	0	0	0
Febrero	64	12	0	0	0	0
Marzo	41	33	0	0	0	0
Abril	65	48	0	0	0	0
Mayo	40	11	0	0	0	0
Junio	100	48	0	0	0	0
Julio	14	0	2	1	0	38
Agosto	197	71	0	0	0	0

3.2.3.2 Infección experimental

Las infecciones experimentales de los oribátidos con Anoplocefálidos de équidos se realizaron tanto depositando soluciones de agua destilada con huevos de Anoplocefálidos como añadiendo proglotis grávidos a los medios de cultivo en los que se encontraban los ácaros.

Para obtener los huevos de los cestodos vivos, inmediatamente después de obtener los cestodos, se llevaron al laboratorio donde se verificó que los proglotis posteriores eran grávidos y se cortaron con una hoja de bisturí entre los 10-20 últimos segmentos de cada cestodo. Se depositaron en un mortero, donde fueron macerados con agua destilada y después se filtraron utilizando un tamiz de 200 μm de poro, para limpiar los restos del tegumento de los anillos.

Después de colocar la solución de huevos en Falcon de 50 ml se homogeneizó la muestra y mediante el uso de la cámara de McMaster se realizó el recuento para poder calcular el número de huevos por mililitro de solución.

Para realizar la infección experimental con las dos especies de Anoplocefálidos, se utilizaron cultivos de oribátidos. Para cada especie de Anoplocefálido se calculó la concentración de huevos por mililitro necesaria para añadir 50 huevos por ácaro presente en el cultivo en el caso de *A. perfoliata* y 100 huevos por ácaro en el caso de *A. magna*. Se retiraron 30, 45, 60 y 75 días post-infección.

El número de cultivos y el día de retirada para el estudio de los ácaros recuperados se observa en las Tablas 13 y 14.

Tabla 13. Nº de cultivos y día de retirada infección con huevos *A. perfoliata*

Primera infección experimental con huevos <i>A. perfoliata</i>	
número cultivos	día de retirada
1	30
2	45
2	75

Tabla 14. Nº de cultivos y día de retirada infección con huevos *A.magna*

Infección experimental con huevos <i>A. magna</i>	
número cultivos	día de retirada
2	30
2	45
1	60
2	75

Para la especie *A. perfoliata* se realizó una segunda infección experimental con huevos de esta especie añadiendo 100 huevos por ácaro presente en el medio de cultivo, utilizando 12 cultivos como se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Nº de cultivos y día de retirada segunda infección con huevos *A.perfoliata*

Segunda infección experimental con huevos <i>A. perfoliata</i>	
número cultivos	día de retirada
4	30
4	45
3	60
3	75

En todas las infecciones y como los ácaros han sido recogido de un medio ambiente en el que se han producido parasitaciones por Anoplocefálidos, se han utilizado cinco cultivos como controles recogidos; tres de ellos el día 45 post-infección, uno el día 60 post-infección y otro el día 75 post-infección. El método de recuperación de ácaros oribátidos fue también el de Berlese.

Como se detalla en las Tablas 16 y 17 se realizaron también infecciones experimentales añadiendo proglotis grávidos de cada especie en cinco cultivos de ácaros, a la mitad se añadieron ocho grupos de 15 proglotis grávidos de *A. perfoliata* y a la otra mitad de los cultivos se añadieron la misma cantidad de anillos grávidos de la especie *A. magna*.

Tabla 16. Nº de cultivos y día de retirada infección con proglotis *A.perfoliata*

Infección experimental con proglotis <i>A.perfoliata</i>	
número cultivos	día de retirada
2	75

Tabla 17. Nº de cultivos y día de retirada segunda infección con proglotis *A.magna*

Infección experimental con proglotis <i>A.magna</i>	
número cultivos	día de retirada
2	60
1	75

Sin embargo, no en todos los cultivos que se utilizaron para realizar las infecciones experimentales con huevos o proglotis de *A. perfoliata* o *A. magna*, se pudieron recuperar oribátidos, y la cantidad de éstos recuperados osciló desde un 0% de recuperación a un 84%, sin embargo, en uno de los cultivos se recuperaron más oribátidos de los depositados en un principio ya que se reprodujeron en los meses transcurridos para realizar estas infecciones experimentales.

A continuación en las Tablas 18 y 19 se detallan los cultivos utilizados en los dos ensayos de infecciones experimentales en el hospedador intermediario con huevos la especie *A. perfoliata*, especificando tanto el número inicial de oribátidos depositados en cada cultivo como los recuperados, así como el porcentaje de recuperación.

Tabla 18. Cultivos utilizados en la primera infección experimental con huevos de *A. perfoliata* y % de recuperación post infección

Día post-infección	Nº ácaros inicial	Nº ácaros recuperados	% recuperación
30	494	8	1,6%
45	166	10	6%
45	774	162	20,9%
75	200	96	48%
75	200	71	35,5%

En este ensayo también se fue realizada la contaminación de 7 medios de cultivo con huevos de *A. magna*, como queda reflejado en la Tabla 19.

Tabla 19. Cultivos utilizados en la infección experimental con huevos de *A. magna* y % de recuperación post infección

Día post-infección	Nº ácaros iniciales	Nº ácaros recuperados	% recuperación
30	325	214	65,8%
30	204	2	1%
45	577	9	1,6%
45	540	286	53%
60	505	420	83,2%
75	202	65	32,2%
75	103	57	55,3%

En la segundo ensayo de infección experimental con huevos de *A. perfoliata* en la que se utilizaron 14 cultivos de oribátidos mantenidos en condiciones de laboratorio. En la Tabla 20 se muestra el número inicial de oribátidos en cada cultivo así como el porcentaje de recuperación.

Tabla 20. Cultivos utilizados en la segunda infección experimental con huevos de *A. perfoliata* y % de recuperación post infección

Día post-infección	Nº ácaros inicial	Nº ácaros recuperados	% recuperación
30	400	510	127,5%
30	404	185	45,8%
30	408	7	1,7%
30	407	10	2,5%
45	411	113	27,1%
45	417	8	1,9%
45	648	0	0%
45	401	3	0,7%
60	407	2	0,5%
60	543	27	5%
60	388	2	0,5%
75	624	15	2,4%
75	434	4	0,9%
75	400	10	2,5%

Como se puede observar en la tabla 20 en uno de los cultivos el número de ácaros recuperados es mayor que el inicial, debido a la reproducción de los oribátidos en el periodo de tiempo transcurrido para realizar el ensayo, explicada con anterioridad.

Además de los ensayos realizados con huevos de estos Anoplocefálidos en dos cultivos fueron añadidos proglotis en las Tablas 21 y 22 se muestran aquellos cultivos en los que se recuperaron oribátidos, el número inicial de oribátidos depositados en cada cultivo, así como el porcentaje de recuperación y el día post infección en el que fueron obtenidos tanto en las infecciones con proglotis de *A.perfoliata* como en las de *A.magna*.

Tabla 21. Cultivos utilizados para la infección experimental con proglotis de *A. perfoliata* y % de recuperación post infección

Día post-infección	Nº ácaros inicial	Nº ácaros recuperados	% recuperación
75	241	1	0,4%
75	421	267	63,4%

Tabla 22. Cultivos utilizados para la infección experimental con proglotis de *A. magna* y % de recuperación post infección

Día post-infección	Nº ácaros inicial	Nº ácaros recuperados	% recuperación
60	639	186	29,1%
60	373	104	27,8%
75	200	55	27,5%

Como los oribátidos se recogieron en una yeguada donde, mediante necropsias, se había observado diagnosticado la presencia de Anoplocefálidos, se mantuvieron cultivos controles para verificar la posible infección de forma natural de estos oribátidos. Se utilizaron como controles un total de 5 cultivos en los que se detalla el número de oribátidos recuperados en la tabla 23.

Tabla 23. Nº inicial de oribátidos en cultivos controles, porcentaje de recuperación y día retirada

Día puesta Berlese	Nº ácaros inicial	Nº ácaros recuperados	% recuperación
45	200	168	84%
45	215	11	51,1%
45	191	5	2,6%
60	257	142	55,2%
75	179	45	25,1%

3.2.3.2.1 Identificación de oribátidos infectados

Tras la recuperación de los ácaros previamente infectados, mediante el método Berlese; se almacenaron en botes identificados con el número de cultivo al que corresponde. Posteriormente se realiza la identificación de los oribátidos, llegando hasta Familia, utilizando las claves de Subías (comunicación personal).

3.3 Supervivencia de huevos

3.3.1 Material

Para estudiar la supervivencia de los huevos de las especies *A. perfoliata* y *A. magna*, se recogieron cestodos vivos y a continuación se extrajeron los huevos de los proglotis grávidos.

Este estudio se llevó a cabo durante el año 2011, en los meses de Marzo y Mayo se obtuvieron cestodos adultos grávidos de ambas especies.

Los cestodos adultos de *A. perfoliata* fueron obtenidos tanto en ciego como en la válvula ileocecal y los de la especie *A. magna* sólo del intestino delgado.

3.3.2 Recogida y procesado

En ambos casos los cestodos se mantuvieron en agua destilada a una temperatura de 35°C hasta su procesado en el laboratorio. El tiempo máximo transcurrido entre la recogida de los cestodos y la extracción de los huevos fue de 3 horas.

Una vez en el laboratorio se identificaron y separaron los proglotis grávidos del resto del estróbilo con la ayuda de un bisturí y se maceraron en un mortero con agua destilada. Después se filtraron a través de un tamiz de 160 µm de poro.

Se comprobó y cuantificó la presencia de huevos en el homogeneizado, y finalmente se repartieron en tubos Falcon dejando sedimentar y diluyendo hasta obtener unos cien mil huevos en 50 ml de agua destilada.

El mismo día de la recogida se verificó la viabilidad de los huevos al microscopio óptico añadiendo una gota de agua destilada con huevos y otra de azul de metileno 1‰. Con esta tinción vital, los huevos vivos toman una coloración azulada y los muertos permanecen transparentes. La tinción se verificó en todos los casos en el embrión diferenciándola del aparato piriforme. Los porcentajes de supervivencia se verificaron los días 0, +1, +2, +3, +11, +15, +18, +30, +44, +51, +58, +64, +73, +79. Las temperaturas seleccionadas para mantener los huevos en agua destilada fueron: 37°C, 25°C, 20°C, 7°C, 4°C y congelación moderada a -4°C.

Para confirmar la supervivencia de los huevos, tanto de *A. perfoliata* como de *A. magna*, a una gota del homogeneizado de los huevos con agua destilada mantenidos a cada temperatura, se añadieron 20 µl de carbacol (agonista colinérgico) en una concentración 10^{-5} M que produce la contracción de los ganchos del embrión hexacanto para su visualización. También se añadió una gota de azul de metileno para su mejor visualización al microscopio óptico y utilizando el objetivo de 100x se pudo comprobar el movimiento de la oncosfera. Esta comprobación se realizó el día +65 para los huevos de *A. perfoliata* y a las 24 horas de la obtención de los huevos de *A. magna* para comprobar que el estudio de supervivencia de huevos realizado utilizando azul de metileno 1‰ fue correcto.

3.4 Estudio estadístico

3.4.1 Procesado de datos de la prevalencia estacional de *A.perfoliata* en el équido

Los datos obtenidos se han procesado mediante un programa SPSS 13.2. Se ha realizado un test de Chi cuadrado de Pearson para comparar el grado de madurez de los cestodos a lo largo del año.

3.4.2 Procesado de datos de la relación de la parasitación por Anoplocefálidos y edad del hospedador

Los datos obtenidos se han procesado mediante un programa SPSS 13.2. Se ha realizado un test de Chi cuadrado de Pearson para comparar cada tipo de hospedador (potro/adulto) con los cestodos de cualquier especie en total y test de Chi cuadrado de Pearson con una corrección de Montecarlo de dos colas para analizar la frecuencia de cada especie de cestodo en cada grupo de edad de los animales.

4. RESULTADOS



4.1 Estudios en el hospedador definitivo

4.1.1 Resultados *post mortem*

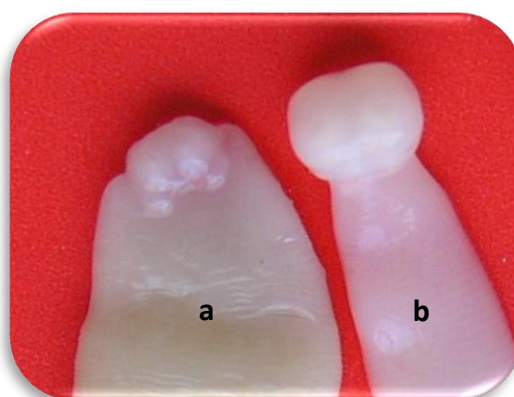
4.1.1.1 Prevalencia de las infecciones por *Anoplocephala* spp.

El estudio *post mortem* se realizó entre los años 2001 y 2003. Durante ese periodo se analizaron 451 paquetes intestinales procedentes de otros tantos animales sacrificados en Guadalajara, León, Segovia y Barcelona. Los resultados del estudio durante ese periodo aparecen reflejados en la Tabla 1 en la que se incluyen el número de animales parasitados por *A. perfoliata*. En la fotografía 2 aparecen las características morfológicas del extremo anterior de *A. perfoliata* y *A. magna*.

Tabla 1. Paquetes intestinales en cada matadero-positivos a *A. perfoliata*

Año	Guadalajara	León	Segovia	Barcelona	Total
2001	14				14
2002	124	92	5	108*	329
2003	59	49			108

*En los 108 digestivos procedentes del matadero de Barcelona no se realizó la apertura del intestino delgado, por lo que no se conoce más que el dato de si los animales estaban parasitados por la especie *A. perfoliata*.



Fotografía 2. Extremo anterior de *A. perfoliata* (a) y *A. magna* (b)

Teniendo en cuenta que en el año 2001 sólo se pudieron estudiar 14 équidos hemos reunido los correspondientes a ese año y al año 2002, por una parte, denominándolo periodo 1; y los del año 2003 por su parte que se agrupan en el periodo 2. Estos datos aparecen en la Tabla 2 en los que también se reflejan los valores de cada especie parásita encontrada.

Tabla 2. Número total de paquetes digestivos y positivos a la infección

Periodo	Nº total de paquetes digestivos	Parasitados por <i>A. perfoliata</i>	Parasitados por <i>A. magna</i>	Parasitados por <i>A. perfoliata</i> y <i>A. magna</i>
Periodo 1	184*	43	13	11
Periodo 2	159	37	26	12

* Sólo se han incluido los paquetes digestivos en los que se realizó la apertura completa, por lo tanto se excluyen los 108 de Barcelona.

La prevalencia total de *A. perfoliata* fue del 30% de los animales muestreados y 18,1% para *A. magna* y en la Tabla 3 se refleja la prevalencia de las infecciones puras y mixtas en los dos periodos indicados.

Tabla 3. Prevalencia de las infecciones por *Anoplocephala* spp.

Prevalencia	<i>A. perfoliata</i>	<i>A. magna</i>	<i>A. perfoliata</i> y <i>A. magna</i>	Total <i>A. perfoliata</i>	Total <i>A. magna</i>
Periodo 1	23,4%	7%	6%	29,3%	13%
Periodo 2	23,3%	16,3%	7,5%	30,8%	23,9%

En la mayoría de los animales se pudo conocer la edad y diferenciar entre potros y adultos (mayores de dos años). En los casos que no fue posible la identificación teniendo en cuenta los datos de la guía sanitaria, se tuvo en cuenta el color de la grasa mesentérica para diferenciar los jóvenes de los adultos.

El número de animales cuyo dato se pudo conocer fue de 376. De ellos 314 (83,5%) eran potros y 62 (16,5%) adultos. En la siguiente tabla (Tabla 4) se muestran el total de animales parasitados por cestodos según su edad teniendo en cuenta si tan sólo estaban

parasitados por una especie o la parasitación encontrada era mixta; es decir con presencia tanto de *A. perfoliata* como *A. magna*. Hay que destacar la ausencia de *A. magna* en animales adultos.

Tabla 4. Animales parasitados por Anoplocefálidos en relación con la edad

“Edad”del animal	<i>A. perfoliata</i>	<i>A. magna</i>	<i>A. perfoliata</i> y <i>A. magna</i>
Potro	69	33	20
Adulto	9	0	0

4.1.1.2 Intensidad de las infecciones por Anoplocefálidos

En cuanto a las cargas parasitarias, teniendo en cuenta el número de ejemplares presentes tanto para *A. perfoliata* como *A. magna*, los datos obtenidos se agruparon en tres apartados (Tabla 5): animales con cargas bajas (1-30 parásitos); animales con cargas medias (31-100 vermes); y animales con cargas parasitarias elevadas (> 101 parásitos).

Tabla 5. Cargas parasitarias

Nº de cestodos	<30	31-100	>101
<i>A. perfoliata</i>	66 84,6%	8 10,3%	4 5,1%
<i>A. magna</i>	35 97,2%	1 2,7%	0 -

En los animales parasitados por *A. perfoliata* las cargas parasitarias fueron más elevadas que las de *A. magna*. Además, en relación con *A. perfoliata*, el 5,1% de los animales tenían más de cien ejemplares, oscilando los valores entre 138-491. En *A. magna* la carga más elevada fue de 64 parásitos.

En *A. perfoliata*, la media fue de 26 cestodos con una desviación de $\pm 54,5$ y en *A. magna* fue de 7,6 con una desviación estándar de $\pm 10,8$.

El estudio de los ejemplares recuperados de las muestras correspondientes al año 2003 permitió comprobar la existencia de ejemplares inmaduros, maduros y grávidos en *A. perfoliata*; y cestodos grávidos y no grávidos en *A. magna* (Fotografía 3).

El número total de ejemplares obtenidos fue de 1739 de los que 1406 eran *A. perfoliata* y 333 *A. magna*. En la Tablas 6 y 7 aparecen reflejados los valores absolutos y porcentuales de los parásitos estudiados y su grado de desarrollo para *A. perfoliata* y *A. magna*.



Fotografía 3. Morfología de los proglotis inmaduros, maduros y grávidos de *Anoplocephala sp.* (de izquierda a derecha)

Tabla 6. Número de ejemplares de *A. perfoliata* y grado de desarrollo

Nº total de parásitos	Número de ejemplares de <i>A. perfoliata</i>		
	Inmaduros	Maduros	Grávidos
1406	325 (23,1%)	853 (60,7%)	228 (16 %)

Tabla 7. Nº de ejemplares de *A. magna* y grado de desarrollo

Nº total de parásitos	Número de ejemplares de <i>A. magna</i>	
	Grávidos	No grávidos
333	151 (45,3%)	182 (54,7%)
100%	45,35	54,65

En relación con el grado de desarrollo de los cestodos en las diferentes estaciones del año, en la Tabla 8 aparecen los datos para ambas especies tanto en valores absolutos como porcentuales.

Tabla 8. Grado de desarrollo de cestodos y estación del año

Estación del año	Nº y % de <i>A. perfoliata</i>			Nº y % de <i>A. magna</i>	
	Inmaduros	Maduros	Grávidos	No grávidos	Grávidos
Verano	39 (18%)	178 (82%)	0 -	5 (20%)	20 (80%)
Otoño	103 (21,2%)	372 (76,5%)	11 (2,3%)	39 (25,8%)	112 (74,2%)
Invierno	183 (26,6%)	302 (43,9%)	203 (29,5%)	0 -	17 (100%)
Primavera	0 -	1 (6,7%)	14 (93,03%)	0 -	2 (100%)

Estos resultados permiten conocer la dinámica estacional de *A. perfoliata* de manera que parecen bien definidos los periodos de mayor riesgo teniendo en cuenta la infección de los hospedadores intermediarios y el desarrollo de cisticercoides. En la figura 1 se refleja la dinámica estacional de *A. perfoliata* en los équidos.

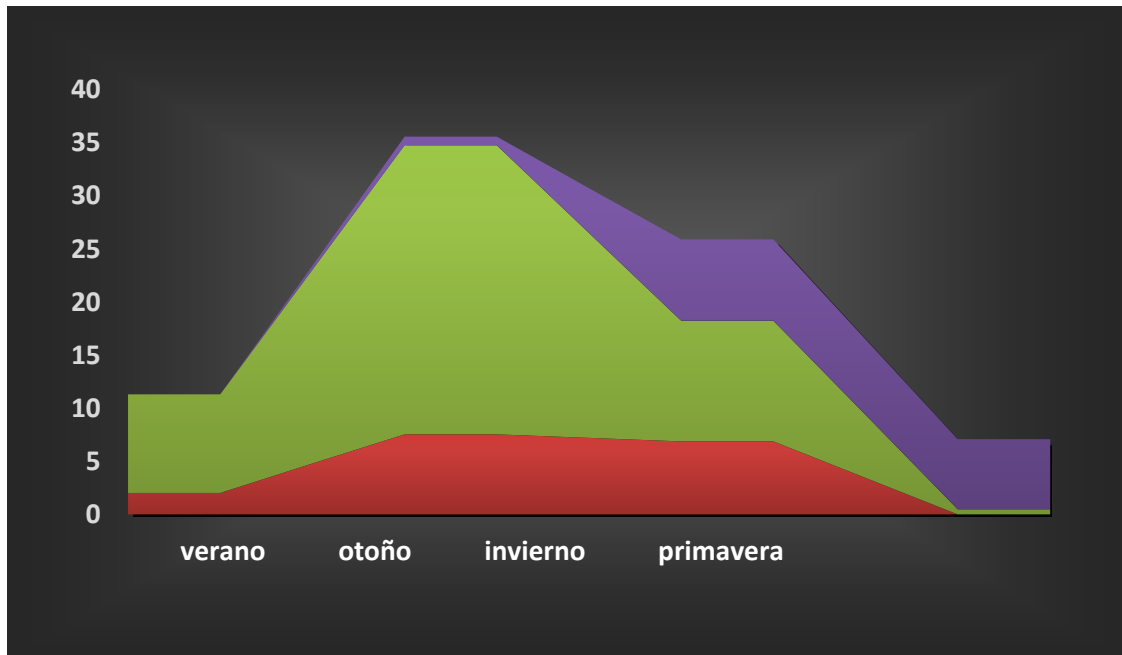


Figura 1. Dinámica estacional de *A. perfoliata* en el hospedador definitivo

4.1.1.3 Alteraciones producidas por *A. perfoliata*

El material recogido durante el periodo 2001-2003, se utilizó también para estudiar las alteraciones macro y microscópicas debidas a la presencia de *A. perfoliata* en la válvula ileocecal. Se recogieron 80 tramos del intestino que comprendía la válvula ileocecal, de los que realmente 50 tenían *A. perfoliata*, y que sirvieron para establecer la intensidad de la infección y las alteraciones presentes.

En la Tabla 9 se muestran el número de válvulas ileocecales recogidas y la región de donde fueron obtenidas las muestras, así como la media de *A. perfoliata* encontradas y su desviación estándar.

Tabla 9. Número de animales en los que se recogió la válvula ileocecal, media de cestodos (*A. perfoliata*) encontrados y desviación estándar

Matadero	Nº animales	Número cestodos	
		Media	Desviación estándar
Guadalajara	18	18,3	±12,8
León	26	22,4	±20,2
Barcelona	6	14,5	±42,6

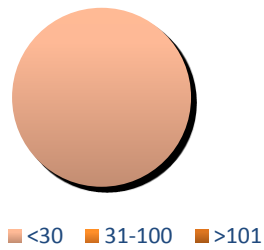
De igual manera, la información sobre la carga parasitaria encontrada se recoge en la Tabla 10, agrupando los resultados obtenidos en aquellos animales que presentaron menos de 30 cestodos, considerándose esta carga baja, una carga media de entre 30 y 100 cestodos y carga elevada más de 100 cestodos por animal.

Tabla 10. Carga parasitaria observada, grado de lesión y número de válvulas ileocecales

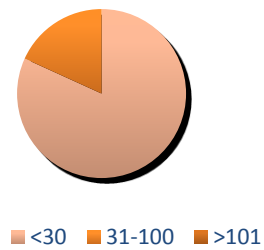
(Nº animales)	Carga parasitaria			Total
	< 30	30-100	>101	
Lesión grado 1	27	0	0	27
Lesión grado 2	9	2	0	11
Lesión grado 3	7	3	2	12
Total nº animales	43	5	2	50

Figura 2. Relación entre grado de lesión y carga parasitaria (porcentaje de animales)

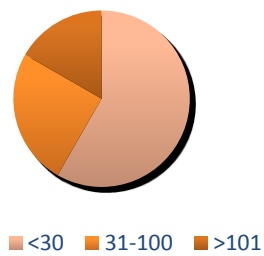
Grado 1



Grado 2



Grado 3

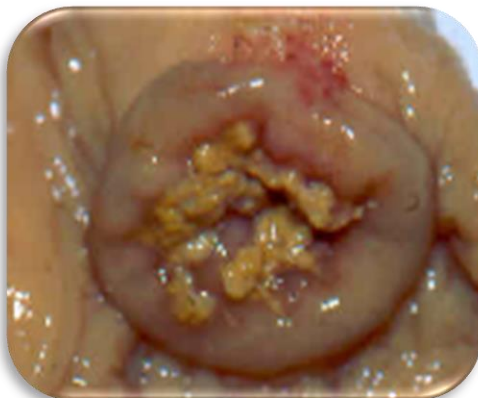


En el estudio macroscópico, las alteraciones presentes en la zona de asentamiento de los parásitos se clasificaron, según Rodríguez-Bertos et al. (1999), en los grados siguientes:



Fotografía 4. Lesión grado 1 de válvula ileocecal

Grado 1. Se caracteriza por la existencia de congestión, edema, hemorragias petequiales e inflamación de la mucosa en la zona de fijación del parásito (Fotografía 4).



Fotografía 5. Lesión grado 2 de válvula ileocecal

Grado 2. Se trata de una enteritis pseudomembranosa, microúlceras y presencia de membranas diftéricas alrededor de los lugares de fijación (Fotografía 5).



Fotografía 6. Lesión grado 3 de válvula ileocecal

Grado 3. Consiste en una enteritis necrótica, con necrosis en la superficie de la válvula ileocecal donde se fijan los vermes. En algunos casos, la zona aparece recubierta por una membrana diftérica y material amarillento con presencia de calcificación y detritus en algunos de los casos (Fotografía 6).

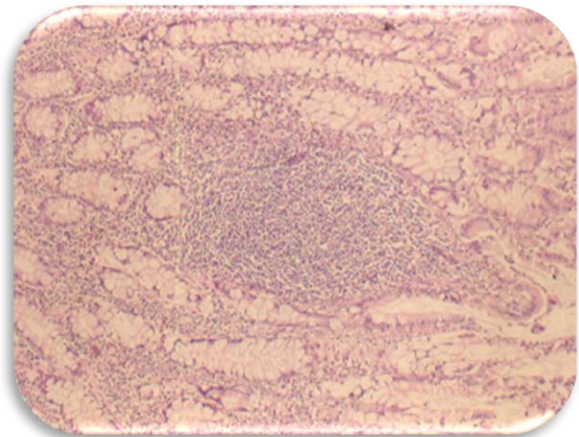
Las lesiones macroscópicas se corresponden con alteraciones microscópicas que también se han clasificado de acuerdo con Rodríguez-Bertos et al. (1999), y se detallan a continuación.



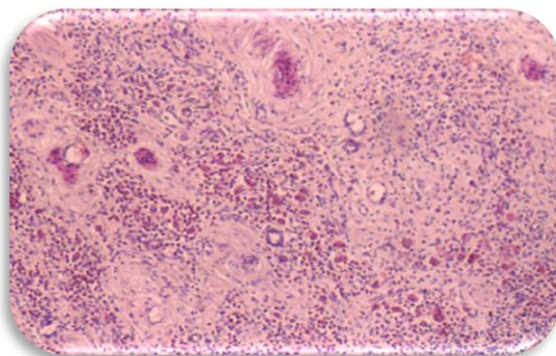
Fotografía 7. Lesión grado 1

Grado 1. Existe una elevada celularidad de la lámina propia debido a incremento en el número de macrófagos, linfocitos, eosinófilos y células plasmáticas. Se observa la presencia de edemas en la mucosa y submucosa, junto con la dilatación de vasos linfáticos periféricos y presencia de infiltrado difuso eosinofílico en la lámina propia, así como en la submucosa (Fotografía 7).

Grado 2. La capa epitelial aparece recubierta por fibrina. La presencia de membranas diftéricas se asocia con necrosis del epitelio intestinal, aunque en algunas regiones la capa epitelial aparece intacta. Existe una fibrosis moderada e infiltrado difuso de eosinófilos en la mucosa y submucosa, así como en capas más profundas, como la capa muscular en la que se observan granulomas eosinofílicos. También hay linfocitos, células plasmáticas y macrófagos. Así mismo, se observa degeneración hialina de la pared de los vasos de mediano tamaño e infartación de ganglios entéricos, viéndose afectados los plexos mioentérico y submucoso (Fotografía 8).



Fotografía 8. Lesión grado 2



Fotografía 9. Lesión grado 3

Grado 3. La mucosa presenta extensas áreas de necrosis con ulceración, integrando a muscular de la mucosa como a la submucosa. Existe tejido de granulación en las zonas necrosadas, con presencia de desorganización estructural de las capas más superficiales afectadas. En la submucosa se puede observar severa fibroplasia con presencia de fibroblastos, depósitos de colágeno y

presencia de infiltrado linfocitario y de células plasmáticas. Además se constata la presencia de áreas de reepitelización en los bordes marginales de la lesión (Fotografía 9).

En la siguiente tabla (Tabla 11), aparecen agrupados el tipo de lesión y el número de parásitos presentes en los tramos ileocecales de los animales estudiados, se puede comprobar que cuanto mayor es el número de vermes mayor es la lesión, aunque en siete válvulas ileocecales con menos de 30 cestodos las lesiones correspondían al grado 3.

Tabla11. Número de válvulas ileocecales, grados de lesión y presencia de cestodos

	Lesión 1	Lesión 2	Lesión 3	Total
Nº válvulas	27	11	12	50
Nº de parásitos ± SD	8,3±5,6	16,6±22,2	50±63,9	

4.1.1.4 Relación entre la edad del hospedador y la intensidad de la infección

El estudio se llevó a cabo entre 2005 y 2007. El número total de paquetes digestivos estudiados fue de 157, cuya procedencia y época de estudio aparecen en la Tabla 12.

Tabla 12. Número de paquetes digestivos estudiados entre 2005 y 2007, procedencia geográfica y mes del muestreo

Zona geográfica	Mes de muestreo											
	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
León	20	4	3	3	4	14	4	14	16	5	7	5
Segovia	4	0	7	3	4	4	0	0	0	19	12	1
Guadalajara	0	0	0	0	0	0	2	0	1	1	0	0
total	24	4	10	6	8	18	6	14	17	24	19	6

Por su parte, los datos correspondientes a la edad y estación del año, durante este periodo aparecen en la Tabla 13.

Tabla 13. Edad de los animales estudiados y época

Estación	Potros	Adultos
Primavera	16	11
Verano	18	11
Otoño	18	17
Invierno	17	14

Aunque el número total de animales muestreados fue de 157, sólo se incluyen los correspondientes a 122 équidos, cuya edad se pudo constatar. Es decir, 53 adultos (43,4%) y 69 animales menores de dos años (56,6%), cuya edad osciló entre 12 y 20 meses.

Al analizar las muestras en relación con la estación del año, se observa que en el otoño el número de muestras fue de 35 (28,7%): 18 potros y 17 adultos; en invierno se estudiaron 31 animales (25,4%) de los que 17 eran potros y 14 adultos; en la primavera, el número de paquetes digestivos fue de 27 (22,1%): 16 potros y 11 adultos; y, finalmente, el número de muestras correspondientes al verano fue de 29 (23,7%): 18 potros y 11 adultos.

De los 122 animales estudiados durante el periodo referido, sólo el 33,6% estaba parasitado por *A. magna* y *A. perfoliata*.

En la mayoría de los animales, las infecciones eran monoespecíficas. *Anoplocephala magna*, apareció exclusivamente en el 24,5% de los paquetes intestinales en los que se detectó la presencia de Anoplocefálidos: *A. perfoliata* en el 65,3%; y sólo en el 10,2% de los animales, coexistieron ambas especies.

Aunque hubo diferencias en los niveles de infección en las distintas estaciones del año, en todas se encontraron animales parasitados. Las prevalencias más elevadas se observaron en otoño y para *A. perfoliata* también elevada prevalencia en primavera; mientras que las más bajas fueron detectadas en verano.

Respecto a los potros, el 17,2% fueron positivos a *A. magna* mientras que el 30,4% estuvieron parasitados por la especie *A. perfoliata*. Tan sólo el 5,8% de estos animales presentaron parasitación mixta.

La distribución de la prevalencia obtenida respecto a los animales parasitados por cestodos y época del año se recoge en la Tabla 14.

Tabla 14. Prevalencia de la infección por *A. magna* y *A. perfoliata* y época del año en animales de < 2 años

Estación	Positivos cestodos	<i>A. magna</i>	<i>A. perfoliata</i>	Parasitación mixta
Primavera	31,3%	12,5%	31,3%	12,5%
Verano	44,4%	16,7%	27,8%	0%
Otoño	50%	22,2%	33,3%	5,6%
Invierno	41,2%	17,6%	29,4%	5,9%

De los animales adultos que formaron parte del estudio la prevalencia total encontrada respecto a las especies de Anoplocefálidos propias de équidos fue del 22,64%, con valores del 3,78% en la especie *A. magna*, y del 20,75% en *A. perfoliata*.

Los resultados de animales parasitados por cada especie de cestodo en cada época, así como su prevalencia se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Prevalencia de la infección por *A. magna* y *A. perfoliata* y época del año en animales >2 años

Estación	Positivos cestodos	<i>A. magna</i>	<i>A. perfoliata</i>	Parasitación mixta
Primavera	36,4%	0%	36,4%	0%
Verano	0%	0%	0%	0%
Otoño	35,3%	11,8%	29,4%	5,9%
Invierno	14,3%	0%	14,3%	0%

En la Tabla 16 se recoge la época del año de mayor intensidad de parasitación, que correspondió con los meses de otoño, con valores del 42,9%.

Tabla 16. Prevalencia de la infección de *A. magna* y *A. perfoliata* por época del año y número de animales positivos en cada época

Estación	Positivos cestodos	<i>A. magna</i>	<i>A. perfoliata</i>	Parasitación mixta
Primavera	9 33,3%	2 7,4%	9 33,3%	2 7,4%
Verano	8 27,6%	3 10,3%	5 17,2%	0 0%
Otoño	15 42,9%	6 17,1%	11 31,4%	2 2,9%
Invierno	9 29%	3 9,7%	7 22,6%	1 3,2%

En este estudio también se recogieron e identificaron los cestodos para poder establecer las cargas parasitarias encontradas en el hospedador.

Los animales que se incluyeron en este estudio fueron sólo aquellos de edad conocida como en el caso anterior, siendo 14 animales parasitados por la especie *A. magna* y 32 animales parasitados por *A. perfoliata*.

Los resultados se agrupan dependiendo de si la carga era baja (entre 1 y 30 cestodos), moderada (30-100 cestodos) o elevada (más de 100 cestodos). Los resultados obtenidos se muestran en las tablas a continuación.

En relación con *A. magna* todos los animales tenían menos de 30 cestodos; el valor medio fue de 6,7, con una desviación de $\pm 6,6$ por animal. El número máximo de ejemplares de *A. magna* recogidos en un animal fue de 26.

En las Tablas 17 y 18 se presentan los datos correspondientes a los animales jóvenes ya los adultos, respectivamente.

Tabla 17. Cargas parasitarias en potros

Nº de cestodos en potros	<30	31-100	>101
<i>A. perfoliata</i>	16 76,2%	4 19%	1 4,8%
<i>A. magna</i>	12 100%	0 -	0 -

Tabla 18. Cargas parasitarias

Nº de cestodos en adultos	<30	31-100	>101
<i>A. perfoliata</i>	9 81,8%	0 -	2 18,2%
<i>A. magna</i>	2 100%	0 -	0 -

En los potros parasitados por *A. perfoliata* las cargas parasitarias fueron más elevadas que las de *A. magna*. Además, en relación con *A. perfoliata*, el 4,8% de los animales tenían más de cien ejemplares, oscilando los valores entre 1-150. En *A. magna* la carga más elevada fue de 26 parásitos.

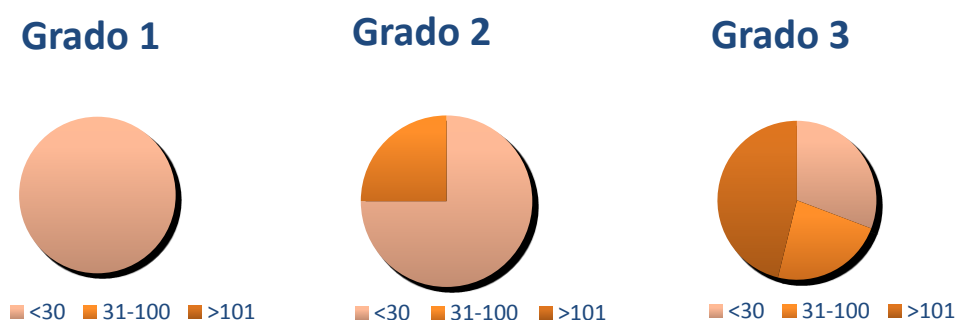
En los adultos parasitados por *A. perfoliata* las cargas parasitarias fueron también más elevadas que las de *A. magna* observándose que el 18,2% de los animales parasitados por *A. perfoliata* tenían más de cien ejemplares, con valores que oscilaban entre 3-216. En *A. magna* la carga más elevada fue de 12 parásitos.

Por su parte, las cargas de *Anoplocephala perfoliata* fueron más altas; un 22% de los animales tenían más de 30 vermes adultos. La cifra media fue de 28,4 vermes, la desviación del $\pm 46,2$, y una distribución muy similar en adultos y potros. El máximo número de adultos de esta especie fue de 216 en un animal. Como puede observarse en la Tabla 19.

Tabla 19. Valores medios y desviación estándar de la infección por *A. magna* y *A. perfoliata* en los animales estudiados

	potros	adultos	todos
<i>A. magna</i>			
$\bar{x} \pm SD$	6,7 \pm 6,9	7 \pm 7,1	6,7 \pm 6,6
rango	1-26	2-12	1-26
<i>A. perfoliata</i>			
$\bar{x} \pm SD$	22,4 \pm 32,2	39,8 \pm 65,7	28,38 \pm 46,18
rango	1-150	4-216	1-216

Figura 3. Relación entre grado de lesión y carga parasitaria (porcentaje de animales)



En este mismo estudio se recogieron muestras de 35 válvulas ileocecales para la valoración macro y microscópica de las lesiones originadas por *A. perfoliata* en esa localización. En este caso no se tuvo en cuenta si se conocía o no la edad del animal parasitado.

La clasificación que se utilizó fue la misma que en estudios anteriores realizados por Rodríguez-Bertos (1999).

La distribución de lesiones y la relación con las cargas parasitarias de *A. perfoliata* se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Carga parasitaria observada, grado de lesión y número de válvulas ileocecales

(Nº animales)	Carga parasitaria			Total
	< 30	30-100	>100	
Lesión grado 1	14	0	0	14
Lesión grado 2	6	2	0	8
Lesión grado 3	4	3	6	13
Total nº animales	24	5	6	35

Como se puede comprobar, cuanto mayor es la carga parasitaria mayor es la lesión. No obstante, aunque si el número de parásitos es bajo también pueden aparecer lesiones graves, catalogadas en el tipo 2, en incluso en el tipo 3. Como se comentó con anterioridad, es importante recordar que aunque las cargas parasitarias detectadas en el estudio no fueron muy altas, las lesiones graves son elevadas.

Con objeto de completar el estudio, procedimos a preparar seis válvulas íleo-cecales con lesiones grado 2 y 3, para su estudio histopatológico mediante técnicas rutinarias de tinción (hematoxilina eosina) e inmuno-histoquímicas (nNOS u óxido nítrico sintasa neural) para verificar lesiones a nivel neuronal.

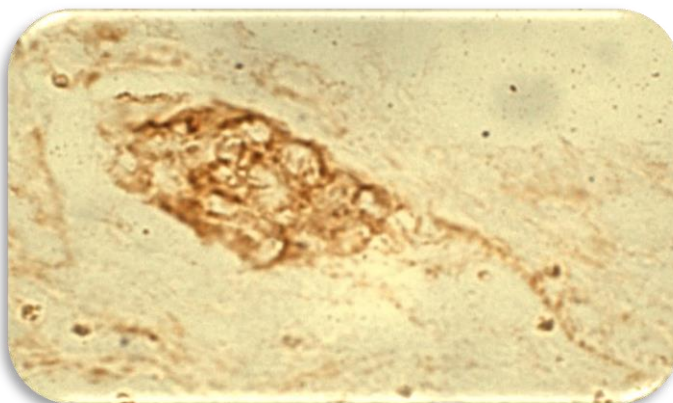
Las muestras con lesiones de grado 2 presentan alteraciones en la válvula ileocecal se corresponden con una enteritis inespecífica y la existencia de células redondas en la lámina propia, principalmente linfocitos y abundantes eosinófilos. Esta lesión es característica de una enteritis crónica con presencia de eosinófilos. En las mismas muestras se evidencia un desprendimiento de la zona más distal de la mucosa superficial. En la submucosa se aprecia, asimismo, un infiltrado de eosinófilos y polimorfonucleares con edema y congestión vascular muy evidentes, así como una concentración de los elementos inflamatorios alrededor de los vasos de mediano calibre a manera de manguitos perivasculares.

En las muestras con alteraciones de grado 3 aparecen úlceras en la mucosa con presencia de focos necróticos, en los que hay abundantes masas de sustancia a manera de malla y acelular, características morfológicas propias de fibrina. Esta alteración llega a afectar a las capas subyacentes tales como la muscular de la mucosa y submucosa.

El proceso inflamatorio de células redondas, principalmente elementos linfocitarios y eosinófilos, alcanza incluso las capas musculares interna y externa. En las capas musculares aparecen también acúmulos de gérmenes que interpretamos como propios de una infección sobreañadida.

En resumen, el estudio histológico demuestra que las lesiones de grado 2 se caracterizan por una enteritis inespecífica crónica con abundantes eosinófilos que afecta a la lámina propia y submucosa. Por su parte, en las clasificadas de grado 3 se aprecia una enteritis fibrino-necrótica más grave y que afecta a todas las capas de la zona anatómica estudiada.

En ambos casos, los ganglios nerviosos de los plexos submucoso y mioentéricos, se han visualizado en muy escaso número y cuando aparecen, presentan neuronas degeneradas siendo esta alteración aún mayor en las muestras con lesión de grado 3. Esta alteración se observa tanto en los cortes histológicos teñidos con hematoxilina eosina como con la técnica inmuno-histoquímica de la Nnos (Fotografía 10).



Fotografía 10. Degeneración neuronal mediante estudio IHQ

El material obtenido tras realizar la técnica de necropsia entre los años 2008 y 2011, se utilizó para evaluar la supervivencia de los huevos de los Anoplocefálidos y realizar las infecciones experimentales de los hospedadores intermediarios.

4.1.2 Resultados *in vivo*

En los estudios *in vivo* se recogieron 100 muestras de heces de animales de la provincia de León, mantenidos en tres tipos de explotación diferentes y se procesaron por utilizando la técnica coprológica de Meana et al. (1998) que aumenta la sensibilidad en la detección de Anoplocefálidos hasta el 54%.

Además se obtuvo sangre de 175 animales en áreas geográficas en las que el diagnóstico *post mortem* no es posible por la ausencia de mataderos. Y 40 sueros de animales de la provincia de León.

En las coprologías realizadas, se comprobaron las características morfológicas de los huevos de los Anoplocefálidos que coinciden con las descritas pero a pesar de las diferencias en el tamaño de *A. perfoliata* y *A. magna* (Soulsby, 1978), los cambios observados en la morfología externa del huevo al utilizar soluciones densas para la flotación de los huevos, hacen muy difícil la diferenciación específica.

Los animales muestreados en León pertenecían a tres tipos de explotaciones equinas, animales en explotación extensiva, animales en intensivo para producción cárnica y équidos en estabulación de un picadero de la provincia.

Este hecho debe destacarse ya que los distintos endoparásitos digestivos de los équidos requieren de unas condiciones medioambientales específicas para poder completar su ciclo biológico, y entre ellos, los cestodos, aparecen con una mayor prevalencia en aquellos animales que permanecen más horas en pastoreo porque estos parásitos necesitan de la presencia e infección del hospedador intermediario, el ácaro oribátido que está en el medio ambiente.

Hay que mencionar a su vez que los animales destinados a la producción de carne eran adquiridos a distintos propietarios de équidos de la provincia y se mantenían sin desparasitar en régimen intensivo hasta su sacrificio, por lo que previamente habían permanecido en explotaciones de carácter extensivo.

En la Tabla 21 se muestra el número de muestras recogidas en cada explotación estudiada así como la prevalencia de Anoplocefálidos obtenida.

Tabla 21. Nº muestras, tipo de explotación y prevalencia de Anoplocefálidos

Número muestras	Tipo de explotación	Prevalencia Anoplocefálidos
45	Extensiva	17,8%
15	Picadero	0%
40	Intensiva	25%

De regiones con ausencia de matadero se analizaron 151 sueros y 40 sueros de animales procedentes de León. En la Tabla 22 se muestran el número de sueros por localización y los rangos de prevalencia obtenidos en las distintas zonas estudiadas.

Tabla 22. Región muestreada, nº de muestras, yeguas y prevalencia de cestodos en la región

Región	Nº de muestras	Nº de yeguas	Yeguas positivas	Prevalencia total cestodos/región
Madrid	37	3	2	30-36%
Andalucía	114	6	2	4-60%
León	40	1	1	25%

En la siguiente Tabla 23 se muestran el número de muestras positivas por yeguada y región analizada.

Tabla 23. Nº de sueros por yeguada y nº de resultados positivos

Región	Nº yeguada	Nº sueros	Nº positivos
Madrid	2	12	3
	3	12	4
Andalucía	1	27	1
	4	20	12
León	1	40	18

4.2 Estudios en el hospedador intermediario

4.2.1 Dinámica estacional de ácaros

El número total de oribátidos recogidos mensualmente durante el año 2011 fue de 51022 todos ellos adultos. Aunque la recogida se realizó en ocho zonas diferentes de la misma yeguada, los datos se presentan agrupados de tal forma que se ha sumado el peso de las muestras recogidas cada mes del año en el momento de su llegada al laboratorio, denominándose peso húmedo. Al término del procesado, se volvieron a pesar y esa determinación se consideró como peso seco. Esta última pesada se realizaba cuando ya no se obtenían más ácaros en la técnica de Berlese, tiempo que osciló entre los 2 y 77 días.

La toma de muestras de tierra (Fotografía 11), se realizó recogiendo inicialmente ocho muestras de tierra, cuatro de zonas donde no pastaban équidos y cuatro de zonas donde sí lo hacían: sin embargo, a los tres meses de comenzar el estudio los caballos ocuparon todas las zonas de muestreo por lo que se agruparon los datos de todas las zonas muestreadas.



Fotografía 11. Toma de muestra de tierra

En la Tabla 24 pueden observar tanto el peso en gramos de las muestras recogidas mensualmente como el peso seco, y el porcentaje de humedad mensual calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de humedad} = \left[\frac{(\text{peso húmedo} - \text{peso seco})}{\text{peso húmedo}} \right] \times 100$$

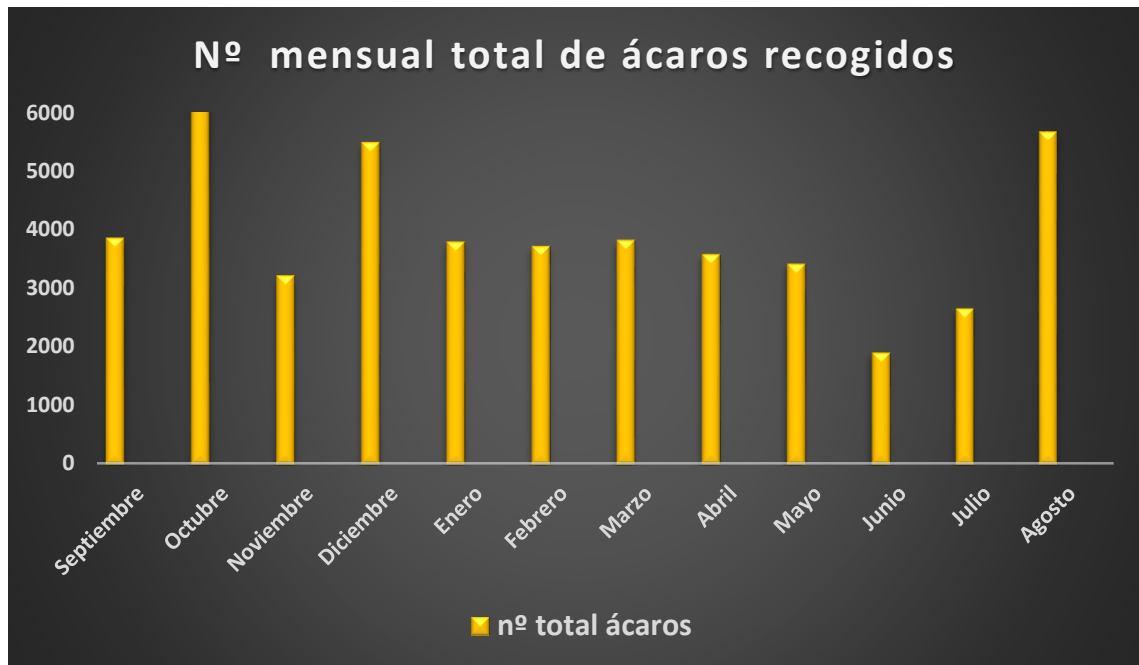
Tabla 24. Número de zonas muestreadas, peso fresco, peso seco y porcentaje de humedad total de muestras recogidas mensualmente

	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto
Nº ZONAS	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
PESO FRESCO	sd	57200	61200	59700	63800	85100	53800	42700	46200	40900	50700	38900
PESO SECO	sd	31200	38600	41400	35400	49800	39400	34600	33400	30500	38600	34000
% humedad	sd	45,45	36,92	30,65	44,51	41,48	26,76	18,96	27,71	25,43	23,87	12,6

El mes en el que las muestras estaban más húmedas fue Octubre con un 45,45%, seguido de las de Enero, con un 44,51%, con la particularidad de que en ese mes la parte superior de las heces estaba recubierta de nieve, y fue retirada antes de calcular el peso fresco. Por último, el mes más seco fue Agosto.

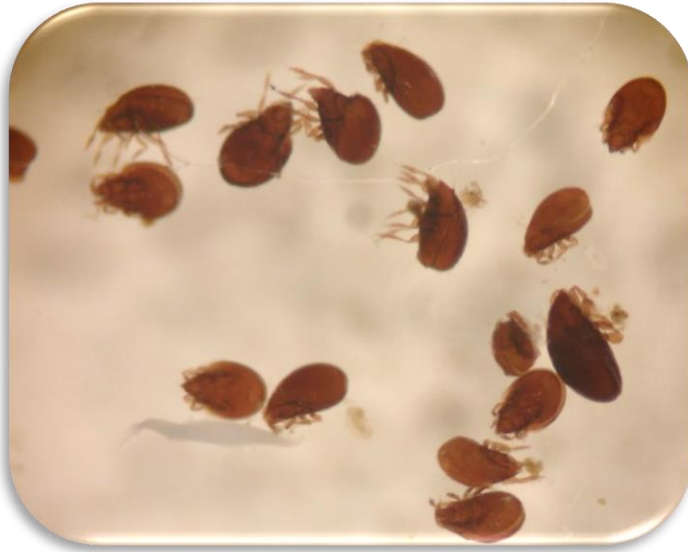
El número de oribátidos total recogidos mensualmente se muestra en la figura 4.

Figura 4. Nº mensual de oribátidos recogidos



Una vez recuperados los oribátidos, se procedió a la identificación microscópica (Fotografías 12 y 13) y al recuento correspondiente.

Como se puede comprobar, el mes en el que se recogieron más oribátidos fue Octubre (19,35% del total), seguido de Agosto (11,11% del total) con 5670 recogidos; y Diciembre, con 5489 oribátidos, es decir el 10,76%.



Fotografía 12. Oribátidos observados con lupa después de ser extraídos con método Berlese



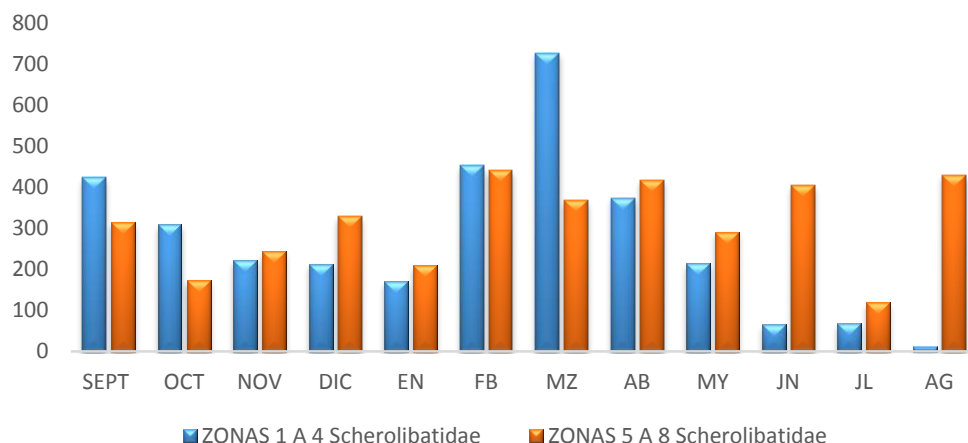
Fotografía 13. Identificación de oribátidos con lupa tras método Berlese

Para confirmar si existían diferencias entre las zonas muestreadas se agruparon todos los resultados en las cuatro que inicialmente procedían de una zona no ocupada por animales y las otras cuatro y se estudió la presencia de cada una de las familias identificadas en cada caso.

El número de oribátidos identificados de la familia Scheloribatidae que se obtienen si agrupamos las zonas 1 a 4 y las zonas 5 a 8, son muy parecidos a lo largo del año, a pesar

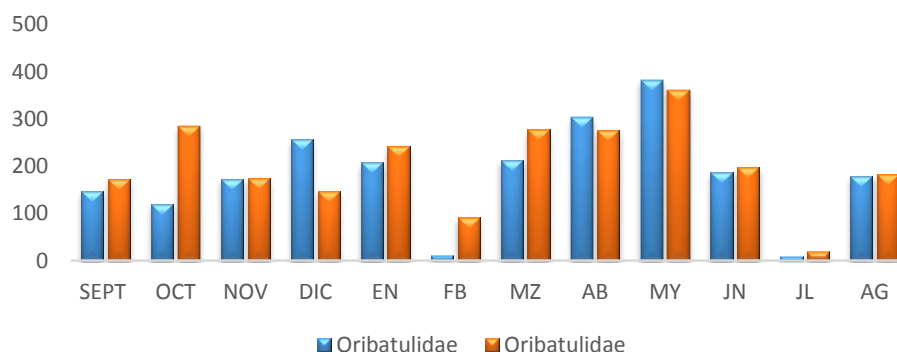
de que en los meses de Junio y Agosto son más prevalentes en las zonas 5 a 8, y en el mes de Marzo en las zonas de 1 a 4, como se puede observar en la Figura 5.

Figura 5. N° de oribátidos de la familia Scheloribatidae recogidos mensualmente en las zonas 1 a 4 y zonas 5 a 8



Respecto a la familia Oribatulidae el número de oribátidos obtenidos, fue muy similar a lo largo del año de estudio como se observa en la Figura 6.

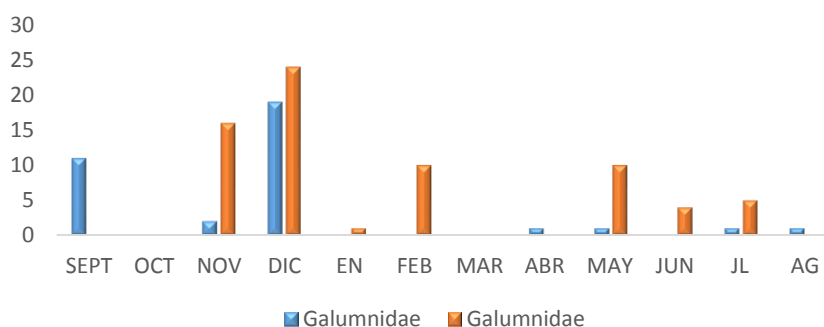
Figura 6. N° de oribátidos de la familia Oribatulidae recogidos mensualmente en las zonas 1 a 4 y zonas 5 a 8.



En tres de las familias de oribátidos identificadas, no todos los meses se recuperaron ácaros; el número máximo detectado en un mes fue inferior a 40. A pesar de este escaso

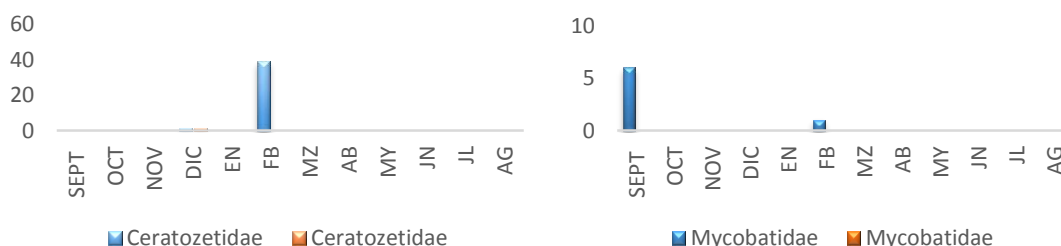
número hubo diferencias entre las zonas 1 a 4 y 5 a 8, en la familia Galumnidae, más prevalentes en las zonas 5 a 8, excepto en Septiembre cuando sólo se detectaron en las zonas de 1 a 4, aunque en bajo número (n=11). Como se observa en la Figura 7.

Figura 7. Nº de oribátidos de la familia Oribatulidae recogidos mensualmente en las zonas 1 a 4 y zonas 5 a 8.



También se apreciaron diferencias en la familia Ceratozetidae, cuyos representantes sólo estuvieron presentes en las zonas de 1 a 4 en el mes de Febrero; así como la familia Mycobatidae, que apareció sólo en Septiembre y Febrero en dichas zonas. Como puede apreciarse en la Figura 8.

Figura 8. Nº de oribátidos de las familias Ceratozetidae y Mycobatidae recogidos mensualmente en las zonas 1 a 4 y zonas 5 a 8.



En la Familia Hemileiidae, sólo se recuperaron representantes en el mes de Julio, tanto en las zonas 1 a 4 como en las zonas 5 a 8, aunque el número de oribátidos recuperados en las zonas 4 a 5 fue el 67,2% del total de ejemplares recuperados de esta familia.

La ausencia de diferencias entre los dos grupos de zonas y las Familias presentes justifican el agrupamiento de los datos y la presentación de todos como una única muestra.

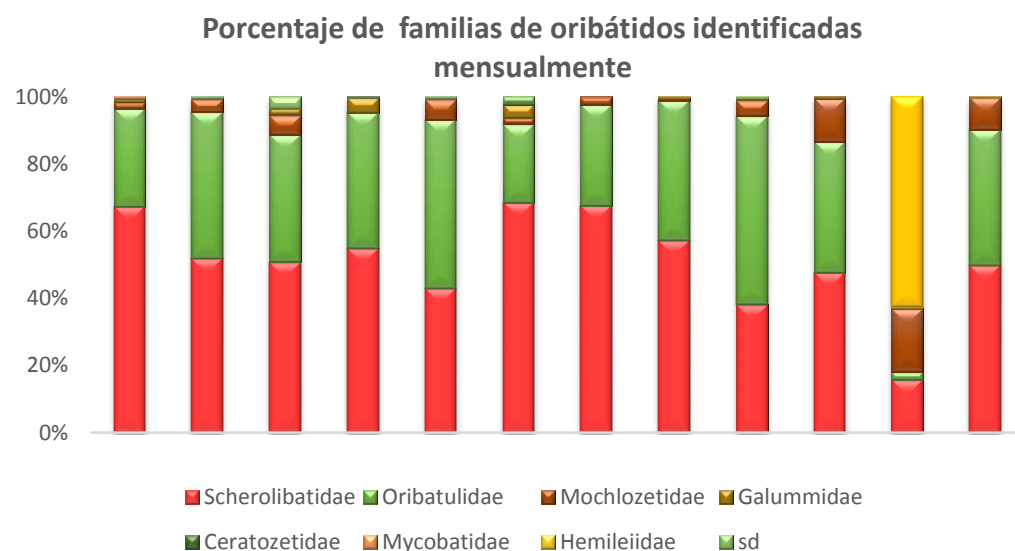
Los oribátidos necesitan una elevada humedad en el medio ambiente y, como se puede comprobar, Octubre fue el mes en el que más oribátidos se recogieron; también Octubre fue el mes en el que las muestras eran más húmedas. El número de ácaros por gramo de tierra seca y por mes de muestreo se observa en la Tabla 25.

Tabla 25. Nº de ácaros por gramo de tierra seca y mes

	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto
Nº ácaros	3861	9871	3220	5489	3798	3721	3825	3582	3421	1907	2657	5670
Peso seco	sd	31200	38600	41400	35400	49800	39400	34600	33400	30500	38600	34000
Ácaros/gramo	sd	0,316	0,083	0,133	0,107	0,075	0,097	0,104	0,102	0,063	0,069	0,167

Durante todos los meses del estudio se identificaron al menos cien ácaros de cada muestra de tierra siguiendo para ello las claves de identificación de oribátidos de Subías (2011). El porcentaje de ácaros identificados así como las familias a las que pertenecían se muestran en la figura 9.

Figura 9. Nº total de familias de oribátidos identificadas mensualmente



En la Tabla 26 se observa el número de oribátidos pertenecientes a cada familia identificados por mes de muestreo

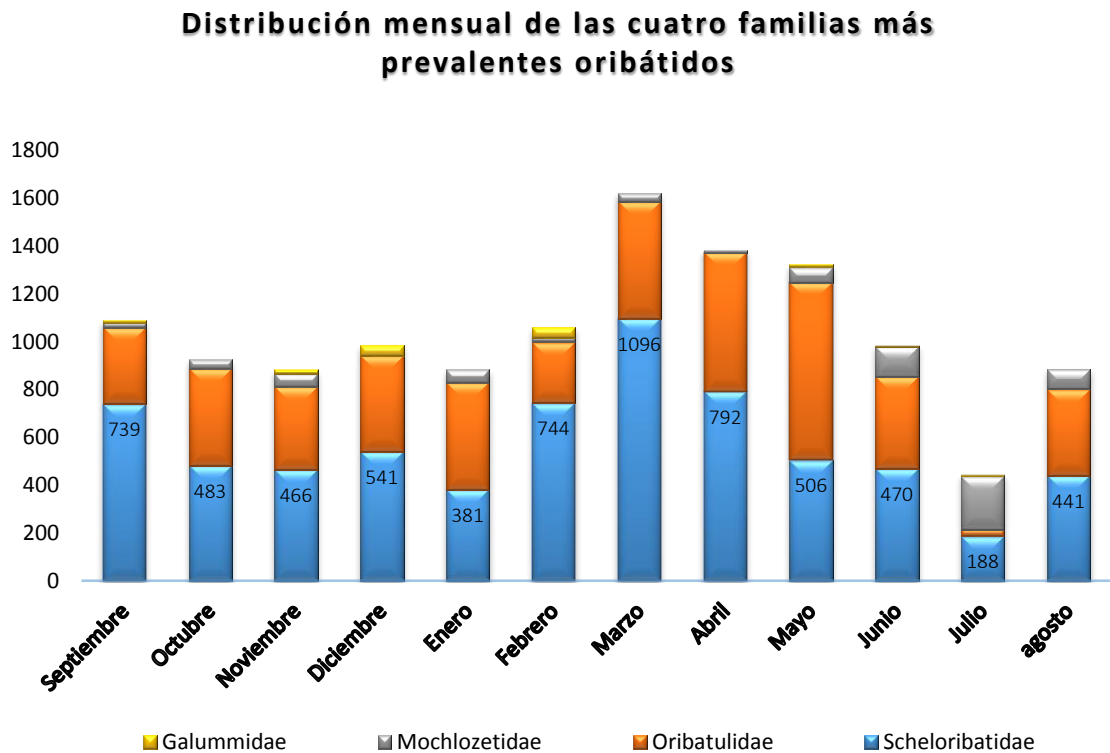
Tabla 26. Nº total oribátidos de familias identificadas mensualmente

Mes	Scheloribatidae	Oribatulidae	Mochlozetidae	Galummidae	Ceratozetidae	Mycobatidae	Hemileiidae	sd
Septiembre	739	320	21	11	0	6	0	0
Octubre	483	405	37	0	0	0	0	5
Noviembre	466	347	53	18	0	0	0	31
Diciembre	541	402	0	43	2	0	0	0
Enero	381	449	53	1	0	0	0	5
Febrero	744	255	20	43	6	0	0	18
Marzo	1096	490	36	0	0	0	0	0
Abril	792	580	13	1	0	0	0	0
Mayo	506	743	64	11	0	0	0	1
Junio	470	384	128	4	0	0	0	0
Julio	188	28	223	6	0	0	743	0
Agosto	441	361	84	1	0	0	0	0

La familia más prevalente fue la familia Scheloribatidae, con representantes en todos los meses del año excepto en Enero, Mayo y Julio. En los meses de Enero y Mayo, fue más prevalente la familia Oribatulidae. Solamente en Julio, fueron más prevalentes las especies de la familia Hemileiidae.

En La Figura 10 se muestra la prevalencia mensual de las familias de oribátidos más prevalentes encontradas a lo largo del estudio.

Figura 10. Prevalencia mensual total de las familias de oribátidos



De todas las familias cuyos representantes se recogieron a lo largo del estudio, las más prevalentes fueron Scheloribatidae, Oribatulidae, Mochlozetidae y Galummidae. Los ejemplares de la familia Oribatulidae fueron prevalentes todo el año, pero más en los meses de primavera; los pertenecientes al género *Galumna* han sido más numerosos en los meses más calurosos del año (Junio, Julio y Agosto).

En la Figura 11, aparecen algunas características morfológicas de los oribátidos superiores más prevalentes encontrados en nuestro estudio.

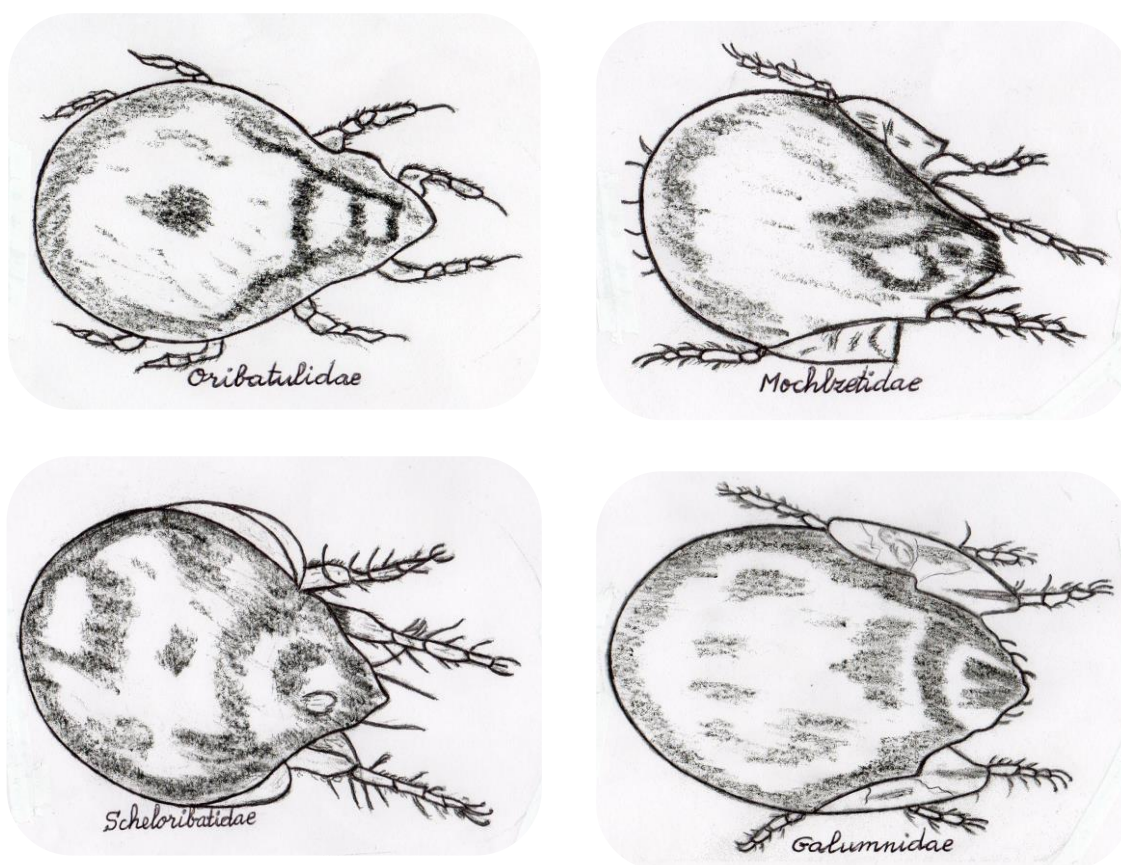


Figura 11. De izquierda a derecha y de arriba a abajo esquema de Oribatulidae, Mochlozetidae, Scheloribatidae, Galumnidae

En la Tabla 27, se recogen los datos correspondientes a los oribátidos recuperados en los diferentes momentos del estudio.

Tabla 27. Nº total de las familias de oribátidos detectadas por estación

	Scheloribatidae	Oribatulidae	Mochlozetidae	Galummidae	Ceratozetidae	Mycobatidae	Hemileiidae	s/d
Primavera	1768	1707	205	16	0	0	0	1
Verano	1368	709	328	18	0	6	743	0
Otoño	1490	1154	90	61	2	0	0	31
Invierno	2221	1194	109	44	6	0	0	23

Como se observa en la Tabla 27, en todas las estaciones del año la familia de oribátido más encontrada es la Scheloribatidae; sin embargo, en la primavera el número de ácaros de esta familia está bastante próximo a los encontrados de la familia Oribatulidae, suponiendo esta última familia el 46,17% del total en esta estación.

Independientemente de la familia de ácaros, la estación del año en la que se recogieron mayor número de oribátidos fue la primavera, que supone un 27,8% del total de los ácaros recogidos a lo largo del estudio. Seguida del invierno con un 27%, verano que supuso el 23,9% y el otoño con un 21,3%, como aparece en la Figura 12.



Figura 12. Prevalencia estacional global de oribátidos por estación

Debido a las diferencias encontradas en las familias de oribátidos en las distintas estaciones en la Figura 13 se puede observar cómo a pesar de ser Scheloribatidae la más prevalente en todas las estaciones, la distribución estacional de esta familia y del resto de familias de oribátidos identificadas varía dependiendo de la estación.



Figura 13. Prevalencia estacional familias de oribátidos

4.2.2 Infección natural

Durante el año 2011, se recogieron ocho muestras de tierra para la recuperación de oribátidos. Posteriormente, se identificaron 500 de cada mes con objeto de realizar una PCR triple y detectar la posible infección natural. El número de oribátidos de cada familia utilizados en este ensayo se muestra en la Tabla 28.

Tabla 28. Nº de oribátidos y familia recogidos para realizar PCR con 500 oribátidos mensuales

Mes	Scheloribatidae	Oribatulidae	Mochlozetidae	Galumnidae
Septiembre	350	150	0	0
Octubre	256	244	0	0
Noviembre	329	138	2	0
Diciembre	289	209	0	2
Enero	264	219	17	0
Febrero	422	43	7	8
Marzo	360	126	13	1
Abril	333	157	9	1
Mayo	203	280	15	2
Junio	190	215	93	1
Julio	111	244	143	2
Agosto	304	154	39	3

Los resultados obtenidos al realizar la PCR se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Resultados de PCR de ácaros recogidos mensualmente

Resultados PCR	Mes del año											
	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto
<i>A. perfoliata</i>	negativo	negativo	positivo	negativo	positivo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	positivo
<i>A. magna</i>	negativo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	positivo	negativo	negativo	positivo
<i>A. mamillana</i>	positivo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo	negativo	negativo	negativo	positivo	negativo	negativo

Como se observa en la Tabla 29 se detectó presencia de ADN parasitario de *A. magna* en 9 de los 12 meses de estudio, siendo los únicos meses con PCR negativa Septiembre, Junio y Julio. Sin embargo, *A. perfoliata* se detectó sólo en los meses de Noviembre, Enero, Febrero, Julio y Agosto; mientras *A. mamillana* fue detectada en los meses de Septiembre, Diciembre y Junio.

Cabe destacar que se detecta ADN parasitario de alguna de las especies de Anoplocefárido parásita de los équidos en todos los meses del año.

Se realizó otro ensayo utilizando el 5% de del total de oribátidos obtenidos por mes de muestreo., agrupando las muestras de las zonas 1 a 4 y de las zonas 4 a 8.

Los resultados de la PCR, se muestran en las Tablas 30 para los ácaros de las zonas 1 a 4; y Tabla 31, para aquellos de las zonas 5 a 8. Apareciendo un “-” en aquellas familias de oribátidos no presentes cuando se recuperó el 5% de los oribátidos totales mensuales.

Tabla 30. Resultados PCR del 5% de oribátidos muestreados mensualmente zonas 1 a 4

Resultados PCR del 5% oribátidos zonas 1 a 4 mensual						
	Scheloribatidae	Oribatulidae	Mochlozetidae	Galumnidae	Ceratozetidae	Hemileiidae
Septiembre	negativo	negativo	-	-	-	-
Octubre	negativo	negativo	negativo	-	-	-
Noviembre	negativo	negativo	negativo	-	-	-
Diciembre	negativo	negativo	-	negativo	-	-
Enero	negativo	negativo	negativo		-	-
Febrero	<i>A.perfoliata</i> <i>A.mamillana</i>	negativo	-	negativo	<i>A. mamillana</i>	-
Marzo	negativo	negativo	negativo	-	-	-
Abril	negativo	negativo	-	-	-	-
Mayo	negativo	negativo	<i>A. magna</i>	-	-	-
Junio	<i>A. perfoliata</i>	negativo	negativo	-	-	-
Julio	negativo	-	negativo	-	-	<i>A. magna</i>
Agosto	-	negativo	negativo	-	-	-

Como se observa en la Tabla 30, sólo en los meses de Febrero, Mayo, Junio y Julio se detectó presencia de ADN de Anoplocefálidos en los oribátidos.

Oribátidos parasitados por *A. perfoliata* fueron detectados en los meses de Febrero y Junio perteneciendo todos a la familia Scheloribatidae; mientras que ADN de *A.magna* se detectó en Mayo y Julio, en las familias de oribátidos Mochlozetidae y Hemileiidae.

La presencia de ADN de *A. mamillana* fue detectada en el mes de Febrero, en oribátidos de la familia Scheloribatidae y Ceratozetidae.

Tabla 31. Resultados PCR del 5% de oribátidos muestreados mensualmente zonas 5 a 8

Resultados PCR del 5% oribátidos zonas 5 a 8 mensual						
	Scheloribatidae	Oribatulidae	Mochlozetidae	Galumnidae	Ceratozetidae	Hemileiidae
Septiembre	negativo	<i>A. perfoliata</i>	negativo	-	-	-
Octubre	negativo	negativo	-	-	-	-
Noviembre	negativo	negativo	-	-	-	-
Diciembre	negativo	negativo	-	negativo	-	-
Enero	negativo	negativo	-	-	-	-
Febrero	<i>A. perfoliata</i>	negativo	-	-	-	-
Marzo	negativo	negativo	-	-	-	-
Abril	<i>A. perfoliata</i>	negativo	-	-	-	-
Mayo	negativo	negativo	-	-	-	-
Junio	negativo	negativo	-	-	-	-
Julio	negativo	-	<i>A. perfoliata</i>	negativo	-	negativo
Agosto	<i>A. perfoliata</i>	negativo	-	-	-	-

En las zonas 5 a 8 tan sólo fue detectado ADN de *A. perfoliata*, en los meses de Septiembre, Febrero, Abril, Julio y Agosto. A pesar de que en el mes de Septiembre en el que también se realizó una PCR de oribátidos de la familia Scheloribatidae, sólo fue detectado ADN parasitario en la familia Oribatulidae, en el resto de los meses en los que fue detectada la presencia de ADN se obtuvo de oribátidos de la familia Scheloribatidae, excepto en el mes de Julio en el que pertenecían a la familia Mochlozetidae, destacando que en este mes no fueron recogidos ácaros de la familia Scheloribatidae.

4.2.3 Infección experimental

El total de oribátidos utilizados para la infección experimental fue de 19.176. Todos ellos habían sido recogidos entre Septiembre de 2010 y Febrero de 2011. Se realizaron 53 cultivos, oscilando el número de oribátidos entre 50 y 740, mantenidos en condiciones controladas en el laboratorio (Fotografía 14).



Fotografía 14. Mantenimiento en laboratorio de cultivos de oribátidos

En la primera infección experimental con huevos de *A. perfoliata*, sólo se recuperó el 14,8% del total de ácaros iniciales, aunque el valor osciló entre 1,6 y 35,5%.

En la Tabla 32 se recogen los datos sobre el número y porcentaje de ejemplares correspondientes a la primera infección experimental realizada con huevos de la especie *A. perfoliata*.

Tabla 32. Nº de oribátidos y % familias identificados primera infección experimental con huevos *A. perfoliata*

Día retirada post-infección	Nº ácaros recuperados	Scheloribatidae	Oribatulidae	Mochlozetidae
Día 30	8	2 25%	5 62,5%	1 12,5%
Día 45	1	0 0%	1 100%	0 0%
Día 45	162	116 71,6%	42 25,9%	4 2,5%
Día 75	99	70 72,9%	26 27,1%	0 0%
Día 75	71	53 74,6%	18 25,4%	0 0%

Los resultados de la PCR realizada para la detección de ADN de *A. perfoliata* se reflejan en Tabla 33.

Tabla 33. Resultados PRC primera infección de oribátidos con huevos de *A. perfoliata*

Resultados PCR infección oribátidos huevos <i>A. perfoliata</i>		
Día post-infección	Agrupación de oribátidos para PCR	Resultado PCR
30	2 Scheloribatidae+5 Oribatulidae+1 Mochlozetidae	positivo
45	2 Oribatulidae+ 4 Mochlozetidae	positivo
45	116 Scheloribatidae	positivo
45	42 Oribatulidae	positivo
75	123 Scheloribatidae	positivo
75	44 Oribatulidae	positivo

En todas las infecciones experimentales realizadas fue detectada la presencia de ADN de *A. perfoliata*.

Los datos sobre el número de oribátidos recuperados en las infecciones con huevos de *A. magna*, y la familia y porcentaje del total de recuperados, aparecen en la Tabla 34.

Tabla 34. Nº de oribátidos y % familias identificados primera infección experimental con huevos *A. magna*

Día retirada post-infección	Nº ácaros recuperados	Scheloribatidae	Oribatulidae	Mochlozetidae	Galumnidae
Día 30	214	100 46,7%	113 52,8%	0 0%	1 0,5%
Día 30	2	1 50%	1 50%	0 0%	0 0%
Día 45	9	1 11,1%	8 88,9%	0 0%	0 0%
Día 45	286	272 95,1%	13 4,5%	0 0%	1 0,4%
Día 60	420	259 61,7%	161 38,3%	0 0%	0 0%
Día 75	65	44 67,7%	18 27,7%	3 4,6%	0 0%
Día 75	57	40 70,2%	16 28,1%	0 0%	1 1,7%

Los resultados de la PCR realizada para la detección de ADN de *A. magna* en los oribátidos recuperados se reflejan en Tabla 35.

Tabla 35. Resultados PCR infección de oribátidos con huevos de *A. magna*

Resultados PCR infección oribátidos huevos <i>A. magna</i>		
Día post-infección	Agrupación de oribátidos para PCR	Resultado PCR
30	100 Scheloribatidae	positivo
30	113 Oribatulidae+ 1 Galumnidae	positivo
30	1 Scheloribatidae+ 1 Oribatulidae	positivo
45	1 Scheloribatidae + 1 Oribatulidae	positivo
45	272 Scheloribatidae+ 13 Oribatulidae + 1 Mochlozetidae	positivo
60	259 Scheloribatidae	positivo
60	161 Oribatulidae	positivo
75	44 Scheloribatidae	positivo
75	18 Oribatulidae + 3 Mochlozetidae	positivo
75	40 Scheloribatidae	positivo
75	16 Oribatulidae + 1 Galumnidae	positivo

Con *A. perfoliata*, se realizó una segunda infección experimental utilizando 14 medios de cultivo en los que se habían depositado oribátidos y habían sido mantenidos en condiciones de humedad y temperatura adecuadas en el laboratorio.

En este caso la infección fue llevada a cabo añadiendo por ácaro presente en el cultivo el doble de huevos que en la primera infección, es decir, 100 huevos por ácaro.

En la Tabla 36 se muestran el número de ácaros recuperados, después de retirarse y recuperarse los oribátidos mediante el método de Berlese, así como el porcentaje de recuperación de cada una de las especies.

Tabla 36. N° de oribátidos y % familias identificados segunda infección experimental con huevos *A perfoliata*

Día retirada post-infección	N ° ácaros recuperados	Scheloribatidae	Oribatulidae	Mochlozetidae	Galumnidae
Día 30	510	510 100%	0 0%	0 0%	0 0%
Día 30	183	182 99,5%	0 0%	0 0%	1 0,5%
Día 30	7	7 100%	0 0%	0 0%	0 0%
Día 30	10	10 100%	0 0%	0 0%	0 0%
Día 45	113	105 93%	7 6,2%	1 0,8%	0 0%
Día 45	8	8 100%	0 0%	0 0%	0 0%
Día 45	3	2 66,7%	0 0%	0 0%	1 33,3%
Día 60	2	0 0%	1 50%	0 0%	1 50%
Día 60	27	0 0%	24 88,9%	0 0%	3 11.1%
Día 60	2	0 0%	2 100%	0 0%	0 0%
Día 75	15	0 0%	14 93,3%	1 6,7%	0 0%
Día 75	4	2 50%	2 50%	0 0%	0 0%
Día 75	10	10 100%	0 0%	0 0%	0 0%

El número de ácaros recuperados en el primer cultivo es superior al número inicial ya que cuando se recogieron los ácaros además de obtener fases larvarias se obtuvieron adultos que no habían sido contabilizados previamente por reproducción de los oribátidos en el tiempo que se habían mantenido en los medios de cultivo hasta realizar las infecciones experimentales.

En estas infecciones experimentales del total de ácaros que inicialmente fueron depositados en los medios de cultivo se pudieron recuperar en total el 14,2% debiendo recordar que en uno de los cultivos se recuperaron más de los oribátidos depositados inicialmente.

Todos los ácaros recuperados fueron identificados como se muestra en la siguiente tabla, en la que se observa el porcentaje de cada una de las familias de oribátidos detectadas en cada uno de los medios de cultivo utilizados para llevar a cabo las infecciones experimentales.

En esta tabla se excluye el cultivo eliminado el día + 45 del que no se pudo recuperar ningún ácaro.

De los ácaros recuperados el 93,5% pertenecieron a la familia Scheloribatidae, el 5,6% a la familia Oribatulidae, tan sólo el 0,2% a la familia Mochlozetidae y el 0,7% a la familia Galumnidae.

La agrupación de oribátidos recuperados de esta segunda infección experimental con huevos de la especie *A. perfoliata*, para realizar la PCR, así como los resultados obtenidos se detallan en la Tabla 37.

Tabla 37. Resultados PCR segunda infección de oribátidos con huevos de *A. perfoliata*

Resultados PCR segunda infección oribátidos huevos <i>A. perfoliata</i>		
Día post infección	Agrupación de oribátidos para PCR	Resultado PCR
30	510 Scheloribatidae	positivo
30	182 Scheloribatidae + 1 Galumnidae	positivo
30	17 Scheloribatidae	positivo
45	115 Scheloribatidae	positivo
45	7 Oribatulidae + 1 Mochlozetidae	positivo
60	27 Oribatulidae + 4 Galumnidae	positivo
75	14 Oribatulidae + Mochlozetidae	positivo
75	12 Scheloribatidae + 2 Oribatulidae	positivo

Además de las infecciones experimentales con huevos de Anoplocefálidos, fueron realizadas infecciones añadiendo proglotis grávidos a los medios de cultivo en los que eran mantenidos los oribátidos en condiciones de laboratorio.

Para las infecciones realizadas con proglotis de *A. perfoliata* se recuperaron un total de 213 oribátidos a los 60 días post infección y un total de 268 a los 75 días.; siendo el porcentaje de recuperación total del 46,9%.

Del total de ácaros recuperados el 47,8% pertenecen a la familia Scheloribatidae y el 52,2% a la familia Oribatulidae.

Las familias identificadas y su porcentaje de aparición se detallan en la Tabla 38.

Tabla 38. N° de oribátidos y % familias identificados segunda infección experimental proglotis *A. perfoliata*

Día retirada post-infección	N ° ácaros recuperados	Schelorbitidae	Oribatulidae	Mochlozetidae
Día 60	213	92 43,2%	121 56,8%	0 0%
Día 75	1	1 100%	0 0%	0 0%
Día 75	267	137 0%	130 100%	0 0%

La agrupación de oribátidos para realizar la PCR y los resultados se muestran en la Tabla 39.

Tabla 39. Resultados PCR infección de oribátidos con proglotis *A. perfoliata*

Resultados PCR infección oribátidos proglotis <i>A. perfoliata</i>		
Día post infección	Agrupación de oribátidos para PCR	Resultado PCR
75	92 Scheloribatidae+ 121 Oribatulidae	positivo
30	138 Scheloribatidae + 130 Oribatulidae	positivo

En la infección experimental realizada con proglotis grávidos de *A. magna* se recuperaron oribátidos de las familias Scheloribatidae y Oribatulidae en el número y porcentaje que se muestra en la Tabla 40.

Tabla 40. N° y porcentaje de recuperación de oribátidos infección con proglotis de *A. perfoliata*

Día retirada post-infección	N ° ácaros recuperados	Scheloribatidae	Oribatulidae
Día 60	186	186 100%	0 0%
Día 60	104	78 75%	26 25%
Día 75	57	46 80,7%	9 19,3%

La agrupación de oribátidos para realizar la PCR y los resultados se muestran en la Tabla 41.

Tabla 41. Resultados PCR infección de oribátidos con proglotis de *A. perfoliata*

Resultados PCR infección oribátidos proglotis <i>A. perfoliata</i>		
Día post infección	Agrupación de oribátidos para PCR	Resultado PCR
60	186 Scheloribatidae	positivo
60	78 Scheloribatidae	positivo
60	26 Oribatulidae	positivo
75	46 Scheloribatidae + 9 Oribatulidae	positivo

Como los oribátidos utilizados para las infecciones experimentales eran obtenidos de una zona donde se había detectado la parasitación por *A. perfoliata* en los équidos, se utilizaron cinco cultivos que fueron mantenidos durante el estudio y que se retiraron 45, 60 y 75 días después de haber sido mantenidos en condiciones de laboratorio, sin haber realizado en ellos infecciones experimentales.

El número, identificación de familias y porcentaje de recuperación de oribátidos en estos cultivos denominados controles y en los que podemos valorar la infección de forma natural de estos hospedadores intermediarios, se detalla en la Tabla 42.

Tabla 42. N° y % de oribátidos recuperados mantenidos en condiciones de laboratorio sin ser infectados experimentalmente

Día retirada	N ° ácaros recuperados	Scheloribatidae	Oribatulidae	Galumnidae
Día 45	168	65 63,1%	103 36,9%	0 0%
Día 45	11	11 100%	0 0%	0 0%
Día 45	5	0 0%	5 100%	0 0%
Día 60	143	94 65,7%	48 33,5%	1 0,8%
Día 75	45	37 82,2%	8 17,8%	0 0%

La agrupación de estos oribátidos y los resultados obtenidos al realizar la PCR se muestran en la Tabla 43.

Tabla 43. Resultado PCR oribátidos no infectados mantenidos en condiciones de laboratorio

Resultados PCR oribátidos mantenidos en condiciones de laboratorio		
Día de retirada de cultivos	Agrupación de oribátidos para PCR	Resultado PCR
45	76 Scheloribatidae + 103 Oribatulidae	<i>A. magna</i>
60	94 Scheloribatidae + 48 Oribatulidae + 1 Galumnidae	<i>A. magna</i>
75	37 Scheloribatidae + 8 Oribatulidae	<i>A. magna</i>

4.3 Supervivencia de los huevos

La supervivencia de los huevos de Anoplocefálidos, tanto los de *A. perfoliata* como los de *A. magna* sometidos a diferentes rangos de temperatura, ha resultado ser diferente, no sólo teniendo en cuenta las diferentes temperaturas a las que han sido sometidos estos huevos; sino también teniendo en cuenta la especie de cestodo.

Se observó supervivencia de los huevos de *A. perfoliata* fue hasta el día 161, mientras que los de la especie *A. magna* tan sólo sobrevivieron hasta el día 93. En ambos casos la supervivencia a bajas temperaturas fue superior que a temperaturas más elevadas observándose que la mayor viabilidad se produjo en aquellas alícuotas sometidas a congelación leve de -4°C.

Estos datos sugieren que los huevos son más sensibles a las altas temperaturas que a las bajas. El 50% de los huevos no sobrevivieron a más de 20°C en los tres primeros días y entre 4 y 7°C sobreviven entre el 50 y el 70%. A los tres días en congelación el 50% de los huevos conservaban la misma morfología que los vivos.

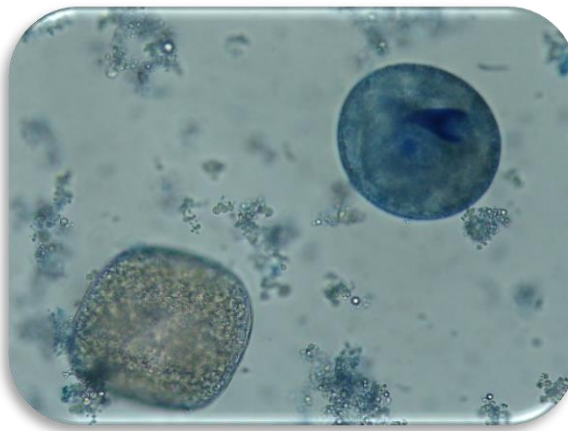
A la semana se confirman los datos anteriores, encontrando vivos menos del 42,30% de los huevos en las temperaturas superiores a 20°C y más del 42,6% en las frías. A los quince días había huevos vivos en todas las temperaturas pero los porcentajes eran muy inferiores a los anteriores no alcanzando el 20% de supervivencia en ningún caso, que excepto en congelación es del 10% a cualquier temperatura en el plazo de un mes. Al cabo de 45 días todavía se observa algún huevo vivo en todas las temperaturas pero el porcentaje de supervivencia es siempre menor del 5%, excepto en congelación que llega a más del 11,7%.

Cabe destacar la morfología variable de la capa externa de los huevos de Anoplocefálidos, que tiende a redondearse. Ello no ha impedido en ningún momento la visualización de las estructuras internas del huevo utilizando un microscopio óptico, y realizando las lecturas a 40 o 100 aumentos para poder obtener una imagen correcta tanto de la oncosfera como del aparato piriforme (Fotografía 15).

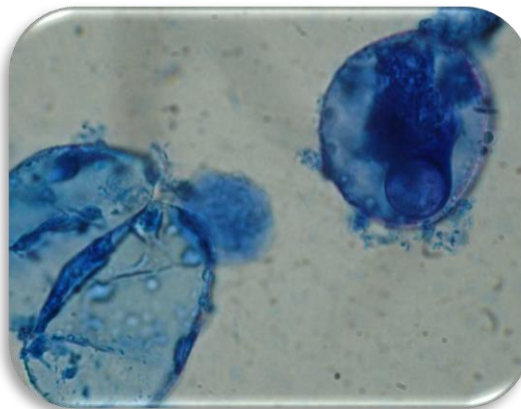
Además de las variaciones observadas en la capa externa o quitinosa de los huevos, se pudo detectar en aquellos huevos mantenidos a bajas temperaturas, sobre todo los mantenidos a temperaturas de congelación, la pérdida de la cubierta externa en algunos de los casos, sin embargo los resultados positivos obtenidos al añadir la tintura vital o azul de metileno, constatan la protección que la capa media o albuminosa del huevo junto con el aparato piriforme, confieren a las oncosferas, a pesar de perder dicha capa (Fotografías 16 y 17).

Además estos huevos que habían perdido la cubierta externa en las ocasiones que fueron sometidos al efecto del carbacol (agonista colinérgico), pudo observarse con nitidez la contracción de los ganchos del embrión hexacanto.

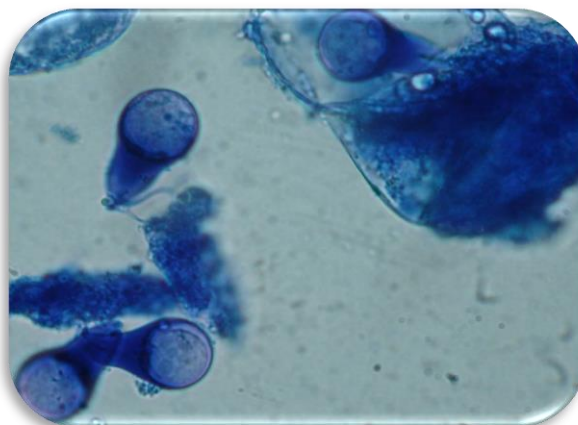
En las Figuras 14 y 15 se muestran los porcentajes de supervivencia de los huevos de *A. magna* y *A. perfoliata* sometidos a las temperaturas del estudio.



Fotografía 15. Tinción vital con azul de metileno y cambios morfológicos de los huevos de Anoplocefálidos



Fotografía 16. Rotura de la capa quitinosa del huevo de Anoplocefálido



Fotografía 17. Aparatos piriformes con embrión hexacanto libres

Figura 14. Supervivencia de huevos de *A. magna* sometidos a distintas temperaturas

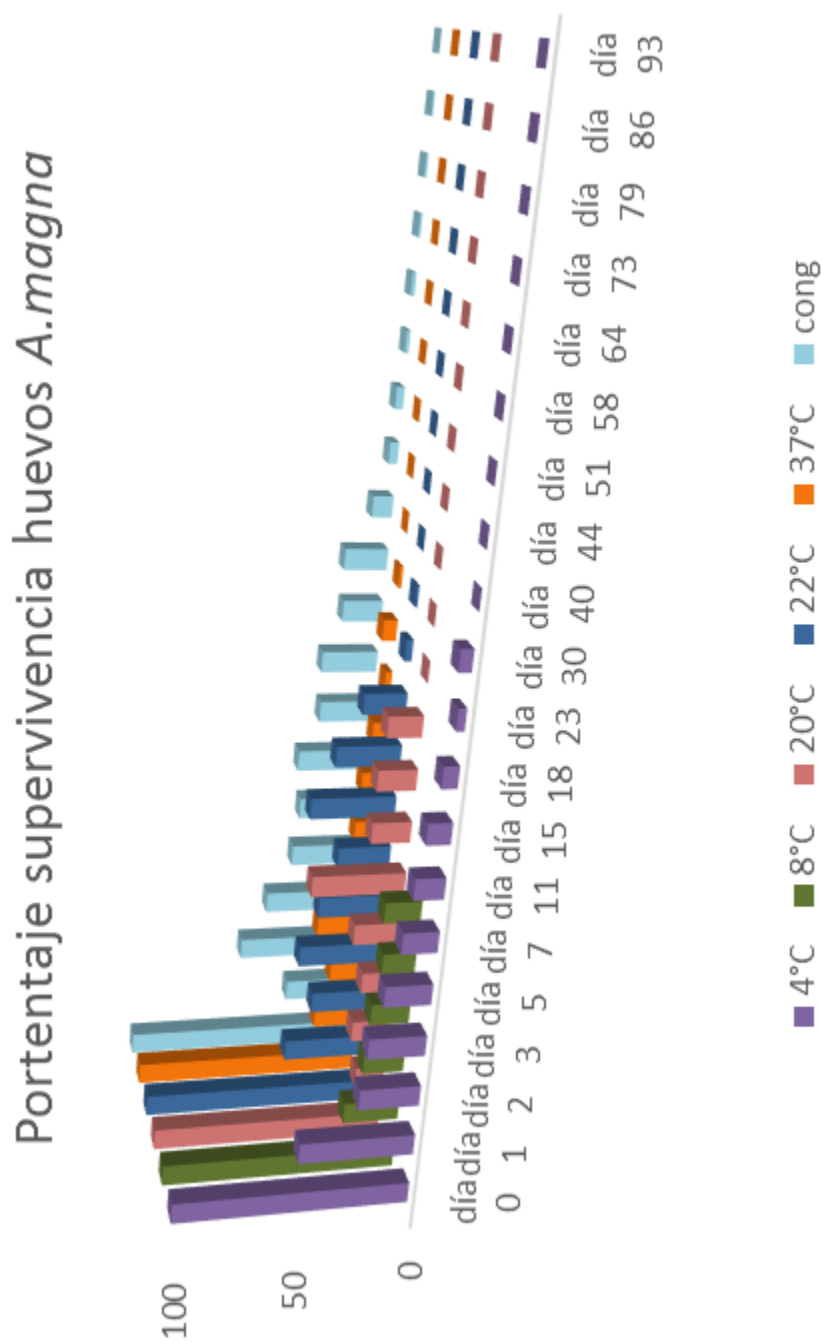
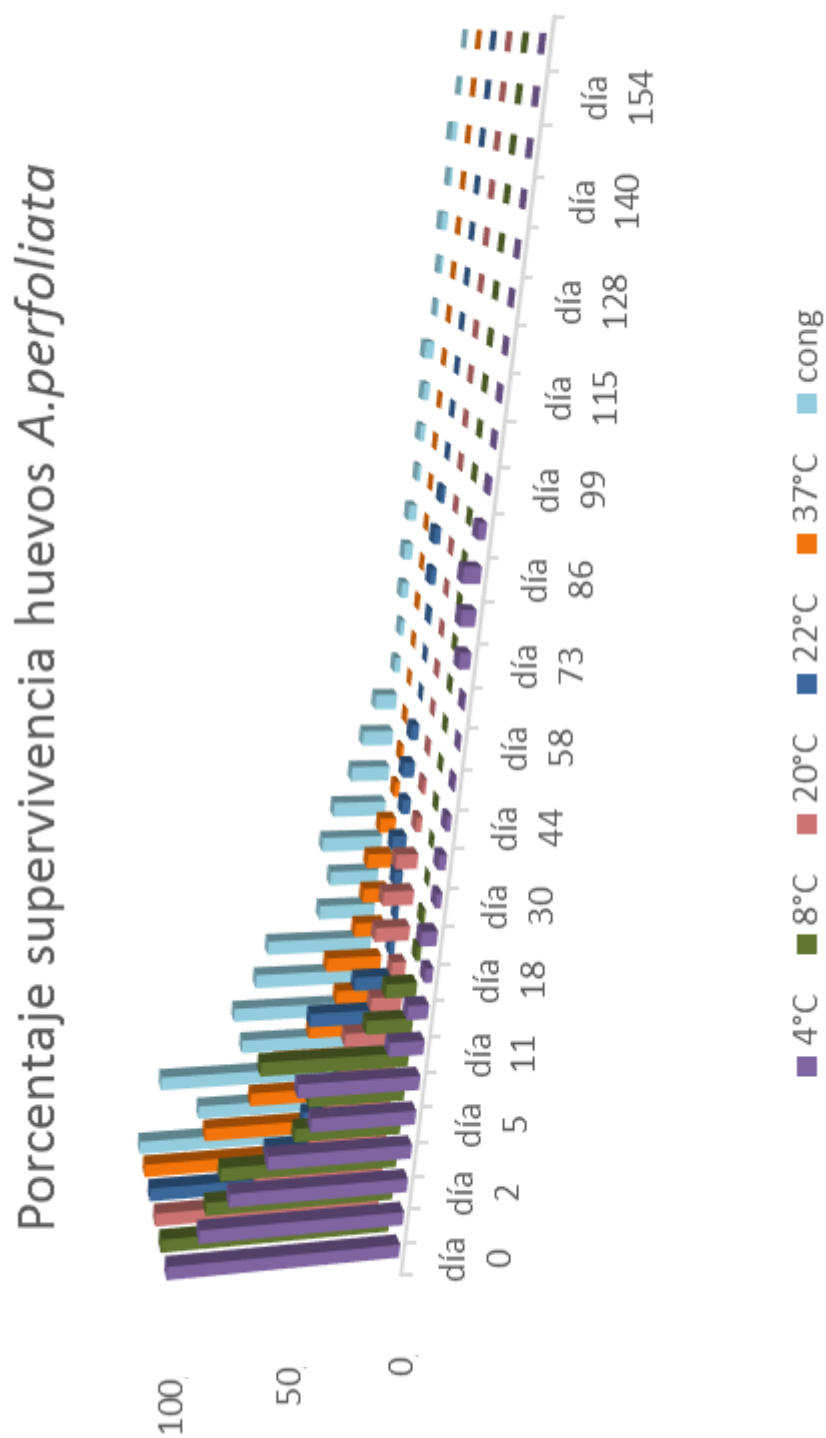


Figura 15. Supervivencia de huevos de *A.perfoliata* sometidos a distintas temperaturas



5. DISCUSIÓN



Prevalencia y estacionalidad de cestodos en el hospedador definitivo

El conocimiento de la prevalencia y estacionalidad de la infección por cestodos en los équidos es, sin duda, una de las principales premisas para poder aplicar medidas metafilácticas y profilácticas adecuadas.

Sin embargo, la escasa sensibilidad de las técnicas de diagnóstico *in vivo* y la falta de especificidad de muchas de ellas o la imposibilidad de diferenciar entre *A. perfoliata*, y *A. magna* mediante análisis coprológicos hacen que el diagnóstico *post mortem* sea el único que permite identificar a los animales que están parasitados y la carga parasitaria real.

Los resultados obtenidos en el estudio *post mortem* muestran que, de las dos especies de Anoplocefálidos parásitos de los équidos, *A. perfoliata* es la más prevalente, sobre todo durante los meses de otoño e invierno. Resultados parecidos han obtenido también otros autores (Lyons et al., 1982; 1983; Tolliver et al., 1987; Collobert-Laugier et al., 2002). En otros países europeos, se ha comprobado que el ciclo biológico puede desarrollarse dentro de amplios rangos de temperatura y humedad que, además, permiten la supervivencia en el medio ambiente.

El estudio de la madurez de los cestodos demuestra que en *A. perfoliata* existe una única generación al año en nuestras latitudes y condiciones climáticas. En otros estudios realizados en países del norte de Europa, ya se había postulado el hecho de que los cestodos parecen tener al menos un ciclo de vida de medio año, debido a que la presencia de nieve en el medio ambiente durante la mitad del año hace que la ingestión de oribátidos infectados sea muy difícil (Ihler et al., 1995).

La presencia de vermes inmaduros desde el verano hasta el invierno sirve para conocer con cierta precisión cuándo se ha podido producir la infección. Estos datos adquieren un mayor valor cuando se comprueba la presencia de porcentajes elevados de cestodos maduros principalmente los meses de verano y otoño-invierno, aunque pueden observarse durante todo el año.

Los cestodos con proglotis grávidos son más prevalentes en el invierno y la primavera, especialmente en esta última estación en la que más del 90% de los estudiados son vermes con proglotis grávidos, lo que demuestra que a finales de invierno y durante el comienzo de la primavera es cuando los proglotis grávidos se desprenden y se eliminan con las heces grandes cantidades de huevos facilitando la infección de los hospedadores intermediarios.

En *A. magna*, la presencia de cestodos con proglotis grávidos no se limitó a los meses de invierno y primavera, sino también al otoño, en los que los proglotis grávidos suponían el 100% de forma parecida a lo que sucede en *A. perfoliata*, si bien abarcando un periodo mayor.

En el segundo estudio *post mortem* realizado entre los años 2005 y 2007 para corroborar los resultados de 2001 y 2003, se pudo constatar que, aunque aparecieron animales parasitados durante todo el año, la prevalencia más elevada se observó durante el otoño (31,4%) y la primavera (33,3%), siendo ésta menor durante el invierno (22,6%) para *A. perfoliata*, siendo además este cestodo más prevalente en todos los casos que *A. magna*.

La prevalencia de cestodos observada en los dos estudios *post mortem*, fue muy parecida, detectándose que aproximadamente un cuarto de los animales presentaba parasitación por la especie *A. perfoliata*, *A. magna* o una parasitación mixta por las dos especies encontradas en estas investigaciones.

Estos resultados son parecidos a los de un reciente estudio realizado en Alemania por Rehbein et al. (2013), en los que se demuestra que existen variaciones estacionales significativas, detectándose las prevalencias más elevadas en otoño (36,1%) e invierno (36,5%) y las más bajas en primavera (17,5%) y verano (15,9%).

En cualquier caso, como la prevalencia de las infecciones depende de la humedad y la temperatura que favorecen la existencia de oribátidos y la supervivencia de los huevos, si estos se excretan cuando las condiciones ambientales son adversas se traducen necesariamente en niveles variables de infección en el hospedador definitivo.

Los métodos de diagnóstico *in vivo* para la detección de cestodos presentan algunas limitaciones que ya hemos comentado. La utilización de técnicas más sensibles y específicas de diagnóstico *in vivo* de estos Anoplocefálidos, facilita la detección de animales parasitados y el conocimiento de los factores que favorecen el ciclo biológico y las épocas de riesgo de infección.

Como la coprología rutinaria utilizada en équidos (MAFF, 1986) para detectar huevos de Anoplocefálidos tiene una baja sensibilidad (Proudman y Edwards, 1992; Nilsson et al., 1995; Meana et al., 1998; Williamson et al., 1998; Rehbein et al., 2011), las muestras de heces recogidas de los tres tipos de explotaciones muestradas, se procesaron por el método descrito por Meana et al. (1998), aunque sólo se detecta algo más del 50% de los animales parasitados.

A todo ello hay que añadir la enorme dificultad en la identificación específica de los huevos, a pesar de que existen diferencias de tamaño entre las especies (Soulsby, 1987), entre otras razones por las alteraciones morfológicas que se deben a la utilización de las soluciones que se utilizan.

La participación de oribátidos en el ciclo vital de los Anoplocefálidos limita la significación de la infección a los animales que se crían de forma extensiva o semiextensiva en los que las tasas de parasitación son superiores a las observadas en animales sometidos a sistemas intensivos o con un tiempo de pastoreo más reducido (Papazahariadou et al., 2009; Kornás et al., 2010).

Como ya hemos comentado con anterioridad, las condiciones medioambientales hacen que en determinadas zonas, el número de oribátidos presentes sea superior a otras, por eso se realizó el estudio coprológico en tres tipos de explotaciones equinas en la provincia de León. Como cabía esperar, los animales en régimen de explotación extensivo presentaron mayor prevalencia de parasitación por Anoplocefálidos que aquellos que pertenecían a un picadero, que podríamos englobar dentro de un régimen semi extensivo. Sin embargo los animales que pertenecían a una explotación intensiva de cebo fueron los más prevalentes en la parasitación por Anoplocefálidos, no siendo relevante este hecho, ya que dichos animales eran comprados a diferentes propietarios, no se desparasitaban y permanecían en este régimen de explotación durante un periodo de tiempo que oscilaba entre los 3 y 4 meses antes de ser sacrificados para consumo de carne.

Además de la coprología para el diagnóstico *in vivo*, se recogieron 191 sueros de distintas regiones de nuestro país, pudiendo detectar presencia de parasitación por Anoplocefálidos en todas ellas. Por lo que se demuestra que en nuestras latitudes y condiciones climáticas, se puede completar el ciclo biológico de estos cestodos.

A partir de la constatación de que las infecciones por *A. perfoliata* constituyen un factor predisponente para la presentación de cólicos en los caballos (Proudman et al., 1998) ha hecho que se preste mayor atención a esta parasitosis – no sólo en España – lo que ha servido para comprobar que existe un incremento en la prevalencia de los anoplocefálidos equinos. Además de esa causa, existen otras como la realización de estudios *post mortem* que ha permitido conocer las repercusiones reales de esta cestodosis; y el conocimiento de los factores bióticos y abióticos implicados en la biología y epidemiología de las infecciones por Anoplocefálidos.

A todo lo anterior hay que añadir que el uso de antihelmínticos muy eficaces frente a una gran mayoría de los helmintos de los équidos, pero sin actividad frente a los Anoplocefálidos (Geerin et al., 1990), ha disminuido la presencia de esos grupos parasitarios y haciendo que la prevalencia de las infecciones por estos cestodos, especialmente de *A. perfoliata*, sea aparentemente mayor.

Conociendo la prevalencia, que en España llega casi al 40% (Meana et al., 2005) y los factores referidos anteriormente, la desparasitación de los équidos debería hacer, al menos, dos veces al año: se aconseja la administración de un cestocida al inicio del otoño para rebajar la carga parasitaria en un momento de riesgo elevado (Meana A, 2008); y al finalizar el invierno o comienzo de la primavera, según regiones, para evitar la contaminación de los pastos con huevos de cestodos.

Relación entre la edad y el sexo del hospedador y la intensidad de la infección

En las últimas décadas, muchos investigadores han estudiado la prevalencia de los Anoplocefálidos en los équidos, sobre todo de la especie patógena, *A. perfoliata*; sin embargo, en alguno de ellos no se especifica la edad de los animales en estudio (Slocombe, 1979).

Para conocer la prevalencia y la posible existencia de relación entre la edad del hospedador y la presencia de estos cestodos, se han llevado a cabo estudios tanto *post mortem* (Lyons et al., 1987; Tolliver et al., 1987; Lyons et al., 2006), como estudios *in vivo* (Slocombe, 1979, Umur et al., 2009) o combinaciones de métodos de diagnóstico *post mortem* con métodos diagnósticos *in vivo* (Lyons et al., 1983).

Sin embargo, los resultados obtenidos han sido bastante controvertidos. En cuanto a *A. magna*, parece que la prevalencia es mayor en animales jóvenes (Lyons et al., 1983). Respecto a *A. perfoliata* algunos autores consideran que es más prevalente en los animales jóvenes (Ershov, 1956; Fukui et al., 1960; Dunn, 1978; Bello, 1979; Reinemeyer et al., 1984; Yoshihara, 1994; Lyons et al., 1997); sin embargo, otros opinan que afecta más a animales adultos (Dunsmore et al., 1985; Mfitilodze, 1989).

Otros autores no han encontrado diferencias significativas entre la prevalencia de *A. perfoliata* y la edad de los animales o el sexo de los mismos (Ihler et al., 1995; Nilsson et al., 1995), inclinándose a pensar que los animales no desarrollan una inmunidad (Nilsson et al., 1995).

En los estudios que hemos realizado hemos tratado de determinar si existe relación entre la presencia de las distintas especies de Anoplocefálidos y la edad de los animales.

En los estudios *post mortem* que hemos realizado para estudiar si existe o no relación de la parasitación de los équidos con las distintas especies de Anoplocefálidos que pueden afectarlos; debemos recordar que la mayor parte de los animales eran potros, ya que eran animales destinados al consumo de carne.

En el primer estudio entre los años 2001 a 2003, parece existir una relación entre la edad y la presencia de *A. magna* debido a que sólo es detectada su presencia en potros. Sin embargo, *A. perfoliata* aunque es más prevalente en potros también fue detectada en animales adultos.

En un segundo estudio cuyo objetivo era detectar si la edad de los animales hace que sean más receptivos a la parasitación por *A. magna*; pudo observarse que existen diferencias significativas ($p < 0,05$) entre potros y adultos, presentando mayor parasitación los animales jóvenes que los adultos; no dependiendo estos resultados de la estación del año.

La especie de Anoplocefálido más prevalente, igual que en estudios anteriores, fue *A. perfoliata* en todas las estaciones tanto en animales jóvenes como en adultos.

No obstante, *A. magna* se encontró en dos animales adultos en los que existía un claro compromiso inmunitario por encontrarse en el periparto. Es decir, no sólo los jóvenes sino, en ocasiones los adultos también pueden estar parasitados por este Anoplocefálido.

Además de estos estudios *post mortem*, en algunas de las explotaciones estudiadas mediante métodos *in vivo* utilizando técnicas coprológicas para conocer la prevalencia de Anoplocefálidos, se tuvo acceso a la edad de los animales, como en el caso de los animales muestreados en la provincia de Huelva; sin embargo y debido al hecho de la imposibilidad de diferenciar la especie de Anoplocefálido detectando huevos en heces, tan sólo podemos afirmar que los resultados obtenidos muestran una prevalencia ligeramente superior en animales adultos que en jóvenes, aunque en animales de cualquier edad detectamos la presencia de animales parasitados por Anoplocefálidos.

Respecto a *A. perfoliata*, los resultados obtenidos en nuestras investigaciones apareciendo tanto animales jóvenes como adultos parasitados por este Anoplocefálido parecen demostrar que es un cestodo que puede parasitar a animales de cualquier edad, siempre y cuando en el medio ambiente en el que viven los équidos se encuentren los oribátidos infectados, siendo posible que la prevalencia de animales parasitados, dependiente o independientemente de la edad, o del estado fisiológico de los animales

en el caso de parasitaciones por *A. magna*, aumente, siempre que exista un incremento de estos oribátidos (Romero et al., 1989).

Relación entre la carga parasitaria y las lesiones producidas por *A. perfoliata*

De los Anoplocefálidos parásitos de équidos, sólo *A. perfoliata* parece ejercer una acción patógena (Proudman y Edwards, 1998), por lo que la mayoría de los trabajos están relacionados con su presencia, la intensidad de parasitación y las alteraciones que produce en la mucosa cecal y alrededor de la válvula ileocecal.

A pesar de que *A. magna* ha sido detectada con frecuencia, en ningún caso se ha podido establecer una relación directa entre su presencia y algún tipo de lesión en los animales infectados (Oliver et al., 1977; Faleiros et al., 2000).

Debemos recordar que la escasa sensibilidad y especificidad de los métodos coprológicos, no permiten ni establecer el número de cestodos presentes en el équido a partir de la carga parasitaria (Proudman et al., 1992; Nilsson et al., 1995; Meana et al., 1998) ni tampoco conocer la especie parásita, debido a las variaciones morfológicas que sufren durante el procesamiento de las muestras. Este hecho hace que el diagnóstico *post mortem* sea el único capaz de demostrar la carga parasitaria real del hospedador.

En España se han detectado las dos especies de Anoplocefálidos equinas, *A. perfoliata* y *A. magna* (Meana et al., 2005). Los estudios realizados para conocer la tasa de parasitación por anoplocefálidos, muestran que la intensidad de parasitación en este país es baja o moderada, hecho que concuerda con otros estudios *post mortem* llevados a cabo previamente en otros países (Bain et al., 1977; Mfitilodze, 1989; Yoshihara et al., 1994; Nilsson et al., 1995) o estudios *in vivo* mediante el uso de técnicas coprológicas en los que las cargas observadas fueron bajas (Kuzmina et al., 2009).

Como se ha indicado, la especie más prevalente fue *A. perfoliata* y, aunque en la mayoría de los animales las cargas parasitarias totales eran bajas o moderadas (<100 ejemplares), en parasitaciones producidas por *A. perfoliata* se llegó a triplicar esa cifra pero en menos del 10% de los digestivos estudiados, lo que coincide con la enorme variabilidad que se ha observado en numerosos estudios (Lyons et al., 1983).

Sin embargo, no existe acuerdo entre qué animales presentan una intensidad de parasitación mayor. Algunos afirman que es mayor en animales jóvenes (Lyons et al., 1997), y otros, que se presenta en animales de más edad (Owen et al., 1988; Lyons et al., 1983, 1984 y 2006).

Conocer la intensidad de parasitación es muy importante ya que numerosos autores relacionan la presencia de signos clínicos cuando los animales presentan elevadas tasas de parasitación por *A. perfoliata* (Slocombe, 1979; Bello et al., 1982; Soulsby, 1978; Urquhart et al., 1987; Carmel, 1988; French y Chapman, 1992).

Este cestodo tiende a localizarse en grupos (Fogarty et al., 1994; Williamson et al., 1997) alrededor de la válvula ileocecal produciendo inflamación prolapso de la porción terminal del íleon (Lyons et al. 1983), sin embargo, también puede fijarse en la pared cecal, sobre todo cuando la intensidad de parasitación es elevada; habiéndose demostrado que las lesiones detectadas son más graves cuando *A. perfoliata* se localiza alrededor de la válvula ileocecal, que cuando se fija en cualquier otra porción mucosa del ciego (Williamson et al., 1997).

Por otra parte en distintas investigaciones llevadas a cabo, se han estudiado las alteraciones producidas por la fijación de estos cestodos, estableciéndose distintos grupos de lesiones, dependiendo de la severidad de las lesiones observadas (Pearson et al., 1993; Rodríguez-Bertos et al, 1999; Williamson et al., 1997; Pavone et al., 2010).

Y a pesar de que el número de cestodos que pueden fijarse en la válvula ileocecal varía de unos estudios a otros, algunos autores relacionan directamente la gravedad de las lesiones con el número de cestodos presentes, de forma que las lesiones observadas serán más graves cuanto mayor número de cestodos estén parasitando a un hospedador (Owen et al., 1988; Pearson et al., 1993; Fogarty et al., 1994; Nilsson et al., 1995; Williamson et al., 1997, Rodríguez- Bertos et al., 1999; Pavone et al., 2010).

En los estudios que hemos realizado también hemos podido observar que las lesiones más graves correspondían con aquellos animales en los que mayores cargas parasitarias se habían detectado.

Por otra parte, observamos que la presencia de pocos cestodos (menos de treinta), siempre que sean de la especie patógena, producen leves o ninguna alteración en la mucosa, habiéndose detectado ligera hiperemia o pequeñas úlceras en los lugares de fijación del Anoplocefálico.

Sin embargo y a pesar del hecho expuesto con anterioridad referente a la relación entre las alteraciones en mucosa, submucosa o incluso la muscular de la mucosa y la tasa de parasitación, como muestran los resultados obtenidos en nuestros estudios, animales en los que se habían detectado bajas tasas de parasitación cuando se realizó el estudio histológico evidenciaron la presencia de alteraciones graves o muy graves, con

alteraciones de plexos submucosos y mioentéricos, compatibles con la producción de cuadros tipo cólico en los équidos (Pavone et al., 2010 y 2011).

Además de las lesiones observadas tanto en la mucosa como en la submucosa cecal relacionada con la intensidad de parasitación por *A. perfoliata*, se han denunciado alteraciones en el plexo nervioso entérico (Burns et al., 1990; Summers et al., 1995), sólo cuando el número de cestodos era moderado o elevado (Pavone et al., 2010) y que nosotros hemos podido corroborar mediante técnicas de inmunodiagnóstico en válvulas ileocecales con lesiones de grado dos y grado tres.

Supervivencia de los huevos

En la bibliografía aparecen numerosos trabajos basados en el estudio de la supervivencia o la viabilidad de huevos de cestodos *sensu lato* (Isobé, 1922; Chowdhury et al., 1956; Silverman, 1954; Meyers, 1957; Laws, 1968; Healt y Smith, 1970; Stevenson, 1983; Negita y Ito, 1994; Wang et al., 1997).

La mayoría de las investigaciones llevadas a cabo para conocer la supervivencia o la viabilidad, se han realizado en cestodos de la Familia Taenidae (Coman, 1975; Gemmel et al., 1987; Ilsoe et al., 1990; Wachira et al., 1991; Veit et al., 1995).

En los estudios que hemos realizado, sólo hemos estudiado la supervivencia de estas formas parásitas mantenidas a diferentes temperaturas y siempre en alícuotas de agua destilada.

Los huevos de los Anoplocefálidos, están formados por tres cubiertas; una quitinosa (la más externa); otra media, albuminosa; y la más interna el aparato piriforme.

En consecuencia, los huevos de Anoplocefálidos, una vez liberados al medio ambiente, están protegidos de las condiciones adversas y pueden permanecer viables hasta que existan circunstancias que permitan que el ciclo biológico continúe.

A pesar de la semejanza morfológica de los huevos de *A. magna* y *A. perfoliata*, algunas características pueden facilitar su identificación (Soulsby, 1978); sin embargo, durante los ensayos para conocer su supervivencia, se producen alteraciones morfológicas que dificultan la identificación.

Independientemente de ellos y teniendo en cuenta que los huevos de los Anoplocefálidos de los équidos son liberados con las heces y no con los proglotis grávidos, la supervivencia es elevada. Los resultados de los estudios de supervivencia de

A. perfoliata muestran una capacidad similar a los de *Moniezia expansa* (Jelenova, 1991), que están protegidos porque se eliminan junto con los proglotis.

Para el estudiar la viabilidad de huevos de cestodos, se han utilizado distintas técnicas, desde los primeros ensayos de Silverman (1954), numerosos autores han realizado estudios sin resultados concluyentes (Urquhart, 1958; Gallie y Sewell, 1970; Williams y Colli, 1970).

La supervivencia y viabilidad de los huevos están condicionadas por la humedad relativa y la temperatura. En los rumiantes, los huevos de *Moniezia expansa* son capaces de sobrevivir más de 160 días, descendiendo su supervivencia a medida que la temperatura aumenta o cuando son sometidos a temperaturas de congelación (Jelenova, 1991).

La diferenciación entre huevos viables y no viables puede hacerse mediante la utilización de tripán azul, de manera que las oncosferas viables se tiñen, como ha confirmado en *Taenia solium* (Wang et al., 1997).

Esa técnica ha sido útil en nuestros estudios para conocer la supervivencia *in vitro* de los huevos de anoplocefálidos, mientras que resultados previos de ensayos de eclosión y viabilidad con otras técnicas, no fueron concluyentes.

Algunos estudios sobre supervivencia de los huevos de Anoplocefálidos muestran que no son capaces de continuar viviendo cuando soportan temperaturas de congelación; sin embargo, nosotros hemos comprobado que los de *A. magna* sobreviven la congelación más de tres meses y más de 4 los de *A. perfoliata*, aunque se producen cambios morfológicos e incluso pérdida de la capa más externa del huevo.

Este hecho facilita la comprensión de la dinámica estacional de cestodos en el hospedador. Si el mayor número de cestodos grávidos se encontraba en las estaciones frías, durante finales de invierno y principios de primavera, es comprensible que los huevos al ser eliminados con las heces, tengan que soportar heladas en el medio ambiente antes de ser ingeridos por los hospedadores intermediarios.

Si no fuesen capaces de superar estas temperaturas de congelación moderada, no podría completarse el ciclo biológico en las condiciones climáticas en las que nosotros hemos llevado a cabo nuestros estudios, como son las regiones de León y Guadalajara, con climas predominantemente continentales.

Prevalencia estacional del hospedador intermediario

Aparte del interés puramente biológico del conocimiento de la prevalencia de los oribátidos en una región determinada por su participación activa en la descomposición de la materia orgánica (Schneider, 2005; Maraun et al., 2007; Norton y Behan-Pelletier, 2009), en Parasitología veterinaria tiene una especial relevancia porque algunos pueden actuar como hospedadores intermediarios en el ciclo biológico de los cestodos equinos.

Los oribátidos tienen una distribución cosmopolita, pudiendo haber más de cien especies diferentes en una misma localización (Behan-Pelletier y Newton, 1999; Schatz y Behan-Pelletier, 2008). La presencia de un mayor o menor número de especies en una región está relacionada con la disponibilidad y variedad de alimentos, de la composición del suelo y la vegetación de la zona (Nielsen et al. 2012).

Por eso, son más numerosos en regiones húmedas con temperatura moderada abundante materia orgánica en descomposición (Mitchell, 1979).

Por diversas razones, la identificación de los oribátidos se realizó sólo a nivel de Familia.

No todas las familias de oribátidos superiores tienen características morfológicas que les permiten actuar como hospedadores intermediarios. Algunas, tienen un aparato bucal con el que destruir mecánicamente el huevo (Caley, 1975) o ingerir el huevo (Ebermann, 1976).

Además, es necesario que la cavidad celómica del oribátido tenga un tamaño suficiente para que en ella se puedan desarrollar los cisticercoides.

De todas las familias, Scheloribatidae, sobre todo el género *Scherolibates*, ha sido descrita como uno de los principales hospedadores intermediarios de Anoplocefálidos, tanto en rumiantes como en équidos (Stunkard, 1937; Bashkirova, 1941; Schuster y Coetzee, 2012).

Todos los oribátidos que hemos recogido para realizar nuestros estudios, fueron oribátidos superiores en su fase adulta, a pesar de que tras la técnica de Berlese se obtuvieron larvas, ninfas y otros oribátidos inferiores. Según la bibliografía consultada son los que actúan como hospedadores intermediarios, aunque se ha observado una ninfa de oribátido parasitado, identificada por Shimano (2004).

El mayor número de oribátidos se recogió en Octubre. Precisamente durante el otoño la actividad reproductiva es intensa coincidiendo con las condiciones climáticas predominantes (temperatura y humedad). A pesar de ello, en el mes de Noviembre el número de oribátidos disminuyó, pero hay que tener en cuenta que como las muestras se tomaron con presencia de nieve en la superficie la emigración vertical hacia zonas más profundas pudo contribuir a que el número fuera bajo.

A pesar de su amplia distribución geográfica, no todas las especies tienen la misma prevalencia mensual, como se puede comprobar en nuestros resultados, referidos a la familia Scheloribatidae. Esto concuerda con los resultados obtenidos por otros autores (Denegri, 1993).

No existe correlación entre el elevado número de oribátidos que pueden encontrarse en la hierba y el porcentaje de oribátidos infectados. Parece que en los parasitados, la capacidad reproductiva es inferior (Kassai y Mchinda, 1965; Ejtminavicjute, 1966; Kuznecov, 1970), independientemente de que, en condiciones “normales” sólo un pequeño porcentaje de la población de oribátidos (menor del 10%) está infectado (Fritz, 1982; Schuster et al., 2000).

La infección de los ácaros tiene consecuencias sobre la supervivencia y otros aspectos, según el género. Por ejemplo, mientras que las especies de *Scheloribates* parasitadas son capaces de sobrevivir mejor en condiciones de desecación y falta de alimento, en las pertenecientes al género *Galumna* no se hallaron variaciones biológicas significativas (Al-Assiuty y Seif, 1995; Shimano, 2004).

Hay que indicar también que existe una relación entre la actividad de los oribátidos (migraciones verticales, etc) y la infección de los équidos cuando acceden al pasto (Isoda et al., 1966; Sanada y Aoki, 1999), hecho que también hemos constatado en nuestros estudios.

El estudio mediante una PCR triple de 500 ácaros recogidos mensualmente, permitió comprobar que, en todos los meses del año, hay oribátidos parasitados; a pesar de que el mayor número de oribátidos se recogió en el mes de Octubre, en ese mes sólo se detectó la presencia de ADN de *A. magna*.

No obstante, ello no significa que la infección se haya producido recientemente lo que hay que tener en cuenta junto con la longevidad de los intermediarios, a la hora de la interpretación de los resultados.

La presencia de ADN de *A. perfoliata* en Noviembre, Enero, Febrero, Julio y Agosto, concuerda con las observaciones en los hospedadores definitivos y la dinámica estacional de la infección por esta especie parásita pues la infección en los oribátidos durante los meses estivales se traducen en infección en los équidos durante los meses de otoño.

Independientemente de la prevalencia mensual total de parasitación y tras la observación de algunas diferencias en las familias de oribátidos, se procedió a la agrupación del 5% de los oribátidos de cada mes en las zonas 1 a 4 y las zonas 5 a 8.

En este caso no en todos los meses se detectó la presencia de ADN de Anoplocefárido, y sí se observaron algunas diferencias entre las zonas muestreadas.

En las zonas 1 a 4 se observaron oribátidos parasitados por las tres especies de Anoplocefálicos, detectándose la presencia de ADN de *A. perfoliata* en Febrero y Junio; *A. mamillana* sólo en Febrero y *A. magna* en Mayo y Julio.

En las zonas 5 a 8 sólo se detectó *A. perfoliata* en oribátidos de la familia Scheloribatidae, Oribatulidae y Mochlozetidae, en los meses de Septiembre, Febrero, Abril, Mayo, Julio y Agosto, descartando la falta de sensibilidad de la técnica utilizada, debido a haber detectado presencia de ADN en un número menor de oribátidos que los utilizados en este caso.

A. mamillana ha sido la especie menos frecuente en todos los estudios que hemos realizado para conocer la infección natural de los oribátidos, encontrándose sólo en los meses de Septiembre, Diciembre, Febrero y Junio, hecho que puede explicar la escasa prevalencia (1%) detectada en los équidos en estudios *post mortem* realizados en otros países como Alemania (Rehbein et al., 2013) o algunos de los datos preliminares del equipo de investigación de la Prof^a Meana (comunicación personal).

Hay que indicar, sin embargo, que se ha detectado esta especie tanto en ejemplares de la familia Scheloribatidae (la más prevalente e importante como hospedador intermediario) como de la familia Ceratozetidae que, a pesar de su menor tamaño, también pueden intervenir en el ciclo vital de estos cestodos.

La presencia de ejemplares parasitados de forma natural pertenecientes a las familias Scheloribatidae, Oribatulidae, Ceratozetidae, Hemileiidae y Mochlozetidae indica su participación en la biología de los Anoplocefálicos equinos, de manera que no son sólo los citados por Andreeva et al. (1993) pueden actuar como hospedadores intermediarios.

Con independencia de que en condiciones naturales sólo un pequeño porcentaje de oribátidos está parasitado (Fritz, 1982; Schuster et al., 2000), hemos observado que la tasa más elevada de infección por *A. perfoliata* tiene lugar en Febrero que es cuando, mediante PCR, comprobados que todos los oribátidos estaban infectados.

Infecciones experimentales

La hipótesis de la participación de los oribátidos en el ciclo biológico de los anoplocefálicos de los équidos se confirman cuando se realizaron infecciones experimentales y se identificaron cisticercoides en el binomio Anoplocefálico- ovinos (Stunkard, 1937); en *A. perfoliata* se confirmó unos años más tarde (Bashkirova, 1941).

En la actualidad conocemos que son muchas las especies de oribátidos superiores que pueden intervenir en el ciclo biológico de estos cestodos, aunque no todas las especies muestran la misma significación biológica (Kates y Runkel, 1948). Por ejemplo, en infecciones experimentales con huevos de *Moniezia spp*, el género *Scherolibates* ha sido el más idóneo, con mayores porcentajes de infección y mayor intensidad de parasitación (Akrami et al., 2007).

En infecciones experimentales realizadas con huevos de *Moniezia expansa* se ha comprobado que la eficacia es elevada: siete de diez del género *Scheloribates* infectados a los 35 días de la infección, manteniendo los ácaros a 28°C y una humedad relativa del 90% (Akrami et al., 2007), aunque los plazos ciatos por otros autores son mayores (1-4 meses) (Boch y Supperer, 1988).

El porcentaje de oribátidos infectados en el medio ambiente no es muy elevado (Fritz, 1982; Schuster et al., 2000) además el número máximo de cisticercoides observados tampoco es muy elevado oscilando entre uno a trece en rumiantes (Stoll, 1935), aunque otros trabajos indican que el número de cisticercoides en cada oribátido no supera los seis (Akrami et al., 2007).

En nuestro trabajo, el estudio microscópico de ácaros infectados experimentalmente con objeto de comprobar la presencia de cisticercoides fue negativo. Por ello, decidimos realizar una reacción de polimerasa en cadena para comprobar la presencia o no de ADN parasitario después de haber sometido a la presencia de huevos de anoplocefálicos durante un periodo de tiempo determinado a los oribátidos.

A pesar de que la infección de los oribátidos se produce por ingestión bien de todo el huevo o bien de la oncosfera en la infección experimental de oribátidos con la especie *A. perfoliata* se añadieron también proglotis grávidos al medio de cultivo; sin embargo,

no se puede descartar la posibilidad de que el proglotis grávido al cabo de un cierto periodo de tiempo se degradase y los huevos quedasen libres en el medio de cultivo como ocurre en condiciones naturales.

Algunos autores han podido detectar la presencia de los cisticercoides en oribátidos infectados con huevos de *A. magna* 30 días post infección (Akrami et al; 2007). Nosotros mediante PCR, hemos comprobado presencia de ADN parasitario a los 30 días post infección.

Sin embargo existe una diferencia entre el estudio mencionado anteriormente y el que hemos realizado, ya que en el primero los oribátidos sólo estuvieron en contacto con los huevos de Anoplocefálidos durante una semana, mientras que en los estudios que hemos realizado bien con huevos o añadiendo proglotis grávidos, los oribátidos se mantuvieron en contacto con los huevos desde el día de la infección, puesto que se añadieron directamente a los medios de cultivo en los que se encontraban.

No puede descartarse la posibilidad de que los oribátidos utilizados para las infecciones experimentales pudieran estar parasitados por Anoplocefálidos teniendo en cuenta su procedencia. Debe tenerse en cuenta la dificultad de obtener en condiciones de laboratorio un número suficiente de ejemplares para las infecciones experimentales. Este hecho ha sido verificado en los oribátidos mantenidos en condiciones de laboratorio sin infectar y con resultados positivos a presencia de ADN de *A. magna*.

Como quiera que detectamos ácaros parasitados de forma natural por *A. magna* en Octubre-Mayo y en el mes de Agosto y que las infecciones experimentales se realizaron en los meses de Septiembre a Febrero, es muy posible que los oribátidos utilizados estuvieran ya infectados por lo que los resultados deben interpretarse con precaución.

Desde un punto de vista práctico, es importante tener en cuenta que la infección experimental de los oribátidos puede tener lugar, lógicamente, a lo largo del tiempo de exposición; y que la demostración de la existencia de ADN parasitario a los 75 días de la infección permite deducir una supervivencia de más de dos meses de los ácaros desde que se produce la infección.

El bajo número de oribátidos recuperados tras la infección experimental, podría hacer pensar que el número de huevos por cada ácaro fuera tan elevado que produjera la muerte; o el porcentaje de recuperación mediante la técnica utilizada fuera muy bajo. No obstante, en uno de los cultivos, el número de ácaros recuperados fue mayor que el número de oribátidos inicialmente depositado en el medio de ya que tras realizar el

método Berlese además de oribátidos adultos, que eran los que se habían añadido en un primer momento a los cultivos se obtuvieron ninfas y larvas de estos artrópodos.

En ácaros de la familia Oribatulidae y Mochlozetidae recuperados 45 días post infección se detectó la presencia de ADN de *A. perfoliata*, lo que confirma su papel como hospedadores intermediarios de anoplocefálicos de los équidos.

Además, en infecciones experimentales con huevos de *A. magna* se realizó una PCR con ácaros de la familia Galumnidae 30 días post infección con resultados positivos. Este es un hecho importante ya que a pesar de que la prevalencia de estos ácaros es menor que los de la familia Scheloribatidae, en otoño e invierno su mayor prevalencia puede tener un cierto papel epidemiológico

Los resultados obtenidos mediante PCR de las infecciones experimentales de oribátidos con huevos o proglotis tanto con *A. perfoliata* como *A. magna*, confirman que una vez eliminados los huevos al medio ambiente, los oribátidos ingieren la oncosfera y desarrollan en su cavidad celómica uno o más cisticercoides, y que pueden detectarse la presencia de ADN parasitario desde el día 30 después de la infección inicial hasta el día 75.

6. CONCLUSIONES



I

Los Anoplocefálidos están presentes en los équidos en nuestras latitudes y condiciones climáticas. De las especies encontradas, *A. perfoliata* es la más prevalente y parece tener una dinámica estacional de una única generación al año. Este hecho se debe a la presencia de cestodos inmaduros desde el verano al invierno, por lo que este es el periodo riesgo de infección de los hospedadores definitivos. Durante el final del invierno y principios de primavera la presencia de cestodos grávidos conlleva la excreción de huevos en las heces y el periodo de contaminación del medio externo.

II

La presencia de Anoplocefálidos en équidos está relacionada con la edad de los animales, aunque depende de la especie de cestodo implicada. La especie *A. perfoliata* afecta a équidos de cualquier edad, aunque es más prevalente en animales jóvenes, mientras que la especie *A. magna* parasita a potros o animales adultos con estados de inmunocompromiso.

III

La especie *A. perfoliata* se aloja alrededor de la válvula ileocecal, formando grupos y produciendo lesiones en los puntos de fijación. La presencia de lesiones graves se observa generalmente en animales con las mayores cargas parasitarias, sin embargo, se ha confirmado que la presencia y acción patógena de pocos cestodos pueden originar graves alteraciones en la mucosa, submucosa, plexos submucosos y mioentéricos.

IV

Los huevos de Anoplocefálidos equinos sobreviven a temperaturas de congelación moderadas más de tres meses. Los huevos de la especie *A. perfoliata*, pueden soportar estas temperaturas más de cuatro meses, a pesar de ciertos cambios morfológicos o incluso la pérdida de la capa más externa que ha podido ser observada. Este hecho, corrobora la dinámica estacional detectada para *A. perfoliata* en el hospedador definitivo, ya que durante los meses de final de invierno y principios de primavera, estas formas parásitas deben soportar bajas temperaturas en las latitudes estudiadas.

V

Se han detectado distintas familias de ácaros oribátidos que pueden actuar como hospedadores intermediarios de cestodos equinos durante todo el año. Sin embargo, tanto el número de oribátidos, como las familias presentes, varía dependiendo del mes en estudio. El mayor número de oribátidos fue recogido en el mes de Octubre. Todas las familias de oribátidos observadas pueden actuar en el ciclo biológico de los Anoplocefálidos, siendo la familia Scheloribatidae la más prevalente a lo largo del estudio.

VI

La presencia de ADN parasitario en las distintas familias de oribátidos utilizadas para las infecciones experimentales, confirma la importancia de los oribátidos de las familias Scheloribatidae, Oribatulidae y Galumnidae en el ciclo biológico de los cestodos en nuestras latitudes. La parasitación de los oribátidos pudo ser confirmada desde los treinta días post infección y hasta los setenta y cinco días. Este hecho permite afirmar que la supervivencia del hospedador intermediario, una vez parasitado, es superior a dos meses.

7. RESUMEN



Los équidos pueden verse afectados por gran variedad de parásitos. De todos ellos, los que viven en el aparato digestivo son los más prevalentes pudiendo producir alteraciones graves como los cólicos. También pueden originar alteraciones extradigestivas debido a las emigraciones intraorgánicas.

Entre las manifestaciones clínicas de mayor prevalencia e importancia en los équidos, se engloba el cuadro cólico como manifestación de dolor visceral abdominal. A pesar de la etiología multifactorial del síndrome cólico, algunos helmintos tienen un papel especialmente destacado. Por ejemplo, la presencia de adultos de *Parascaris equorum* en el intestino delgado puede originar impactaciones, obstrucciones, invaginaciones o roturas intestinales o la presencia de larvas de *S. vulgaris* en las arterias mesentéricas puede derivar en la aparición de cólicos intermitentes, alteraciones en la motilidad, o peritonitis consecuencia de los tromboembolismos producidos por larvas en la arteria mesentérica craneal.

Igualmente, los ciatostominos pueden dar lugar a la aparición de cuadros cólicos consecuencia de intususcepciones cecocecales y cecocólicas.

Sin embargo, no sólo los nematodos son responsables de cuadros cólicos. En efecto, entre los helmintos también hay que citar a una especie de cestodo, *A. perfoliata*, que puede causar cólicos espasmódicos e impactación ileal. Además, este Anoplocefálico se ha relacionado con invaginaciones ileales, ileocecales cecocecales y cecocólicas, torsiones o peritonitis.

El conocimiento de los factores epidemiológicos más relevantes de los distintos agentes parasitarios responsables de estos cuadros, así como las estrategias de control ejercidas tanto en el hospedador como en el medio ambiente, han permitido disminuir la aparición de algunos tipos de cólicos en los équidos, sobre todo los producidos por nematodos. Sin embargo, aún existen muchas incógnitas respecto al protagonismo de los cestodos equinos. El aumento de su prevalencia en los últimos años, ha hecho que numerosos investigadores se hayan preocupado del estudio de estos Anoplocefálicos.

De hecho, en las últimas décadas ha existido un aumento del número de trabajos sobre distintos aspectos de la infección por *A. perfoliata*, sobre todo desde que se demostró la participación de esta especie en cuadros cólicos debido a las alteraciones en la mucosa, submucosa y plexos submucosos y mioentéricos debidas a la fijación de *A. perfoliata* alrededor de la válvula ileocecal.

Muchos trabajos se han centrado en el estudio de la acción patógena y las consecuencias de la parasitación. Sin embargo, la prevalencia de las infecciones por este cestodo, está estrechamente relacionada con la región en donde se han hecho los estudios. Este y otros hechos son algunas razones de que, en los últimos años una de las líneas de investigación del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la UCM, sea el estudio de los cestodos y en especial de las cestodosis equinas.

Gracias a los trabajos realizados, se conoce la prevalencia de las infecciones por cestodos en España, la edad de los animales más afectados por Anoplocefálidos, la intensidad de parasitación en nuestras latitudes y las alteraciones macro y microscópicas que produce *A. perfoliata*.

Entre otros aspectos, también hemos estudiado una parte del ciclo exógeno de estos Anoplocefálidos, pues aunque la supervivencia de los huevos en el medio ambiente se suponía similar a los de los Anoplocefálidos en rumiantes, no existían estudios realizados en estas especies.

Por otra parte, a pesar de conocer algunos de los géneros de oribátidos que pueden intervenir en el ciclo biológico de estos parásitos, se desconocía qué familias son las más prevalentes y epidemiológicamente más significativas como hospedadores intermediarios, su distribución estacional, los plazos desde que se infectan hasta que se puede detectar la infección, o la supervivencia de los ácaros infectados.

Todos estos hechos han hecho valorar la necesidad de estudiar tanto la prevalencia de Anoplocefálidos en España como el estudio de algunos de los factores epidemiológicos implicados en su aparición.

Para el estudio de la prevalencia de la infección en los équidos, se realizaron estudios *post mortem*, debido a la escasa sensibilidad y especificidad de los métodos coprológicos. Estos estudios se utilizaron a su vez para poder valorar la influencia de la edad del hospedador y la parasitación por cestodos, además de conocer la intensidad de la infección por las distintas especies de Anoplocefálidos detectadas y la descripción de las alteraciones macro y microscópicas producidas por *A. perfoliata* alrededor de la válvula ileocecal mediante técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.

En relación con la infección por *A. perfoliata*, una vez realizada la identificación, durante un año se estudió la madurez del cestodo, pudiendo establecer una dinámica estacional de la parasitación en el équido.

La recogida mensual de muestras de tierra y la extracción posterior de oribátidos en una explotación en la que previamente había sido detectada la presencia de *A. perfoliata*,

permitió establecer tanto la dinámica estacional como distintos aspectos relacionados con la infección, tanto en condiciones de campo como en el laboratorio.

Además, estudiamos la supervivencia de los huevos de *A. magna* y *A. perfoliata* con objeto de poder relacionar la excreción de huevos y la infección del hospedador intermediario, así como el tiempo que pueden permanecer viables en diferentes condiciones de temperatura.

Los estudios *post mortem*, han permitido establecer una prevalencia de la infección por Anoplocefálidos en España del 40%. La especie más prevalente ha sido *A. perfoliata* que afecta a animales de cualquier edad, aunque sea más frecuente en los jóvenes; por su parte, *A. magna* parasita solo a potros o a animales inmunocomprometidos, como ocurre en el periodo periparto.

Los estudios nos permiten conocer que el periodo de riesgo de la infección por *A. perfoliata* comprende el verano, otoño e invierno, lo que facilita la programación de planes profilácticos que eviten los efectos indeseables de las infecciones por estos cestodos.

Estas alteraciones varían desde pequeñas úlceras en los lugares de fijación a zonas necróticas dependiendo de la intensidad de parasitación, siendo las lesiones más graves las que se producen por cuando el número de parásitos es más elevado. Sin embargo un número menor a treinta cestodos puede originar alteraciones compatibles con la aparición de cólicos debido a las alteraciones en los plexos submucosos y mioentéricos.

Para poder establecer un control estratégico de estas cestodosis, además de conocer las consecuencias de la parasitación en los équidos y la edad en la que pueden verse afectados, es imprescindible el conocimiento de otros factores del parásito, como la supervivencia de los huevos en el medio ambiente una vez eliminados con las heces.

Se ha comprobado la necesidad de una elevada humedad medio ambiental para la supervivencia de los huevos, a la vez que se han observado diferencias entre *A. perfoliata* y *A. magna*. Los huevos de *A. perfoliata* sobreviven más de ciento sesenta días, al igual que los huevos de Anoplocefálidos de rumiantes, frente a los ochenta y seis que sobreviven los de *A. magna*. Sin embargo, esta supervivencia depende de la temperatura, y a diferencia que sucede con otros Anoplocefálidos, a pesar de los cambios que sufren en su morfología e incluso pérdida de la capa externa, los huevos de los Anoplocefálidos equinos sobreviven más a bajas temperaturas o incluso cuando son sometidos a congelación. Hecho que corrobora los resultados obtenidos en la dinámica estacional de *A. perfoliata* en el équido, ya que es durante el final del invierno y principios de primavera cuando estos huevos son eliminados al medio ambiente.

Los oribátidos ingieren o la oncosfera o el huevo completo, y en su interior se desarrolla el cisticercoide (forma larvaria); sin embargo, a pesar de que estos artrópodos son muy comunes en terrenos húmedos y con abundante materia orgánica, no todas las familias de oribátidos Superiores tienen la misma importancia biológica dentro del ciclo de los Anoplocefálidos, ni están presentes en la misma proporción durante las distintas estaciones.

Durante el invierno y la primavera es cuando ha sido detectada la mayor prevalencia, destacando el mes de Octubre en el que el número de oribátidos fue mayor. De los ácaros identificados, la familia Scheloribatidae fue la más prevalente, seguida de la familia Oribatulidae en la que se pudieron observar diferencias estacionales siendo más prevalentes estos oribátidos durante la primavera y el otoño. Además, los oribátidos de la familia Hemileiidae sólo se detectaron durante el verano y no en otras estaciones, lo que corrobora las diferentes necesidades tanto nutricionales como climáticas de la mayoría de las familias de oribátidos, a pesar de que en familias como la Galumnidae no se observaron diferencias estacionales.

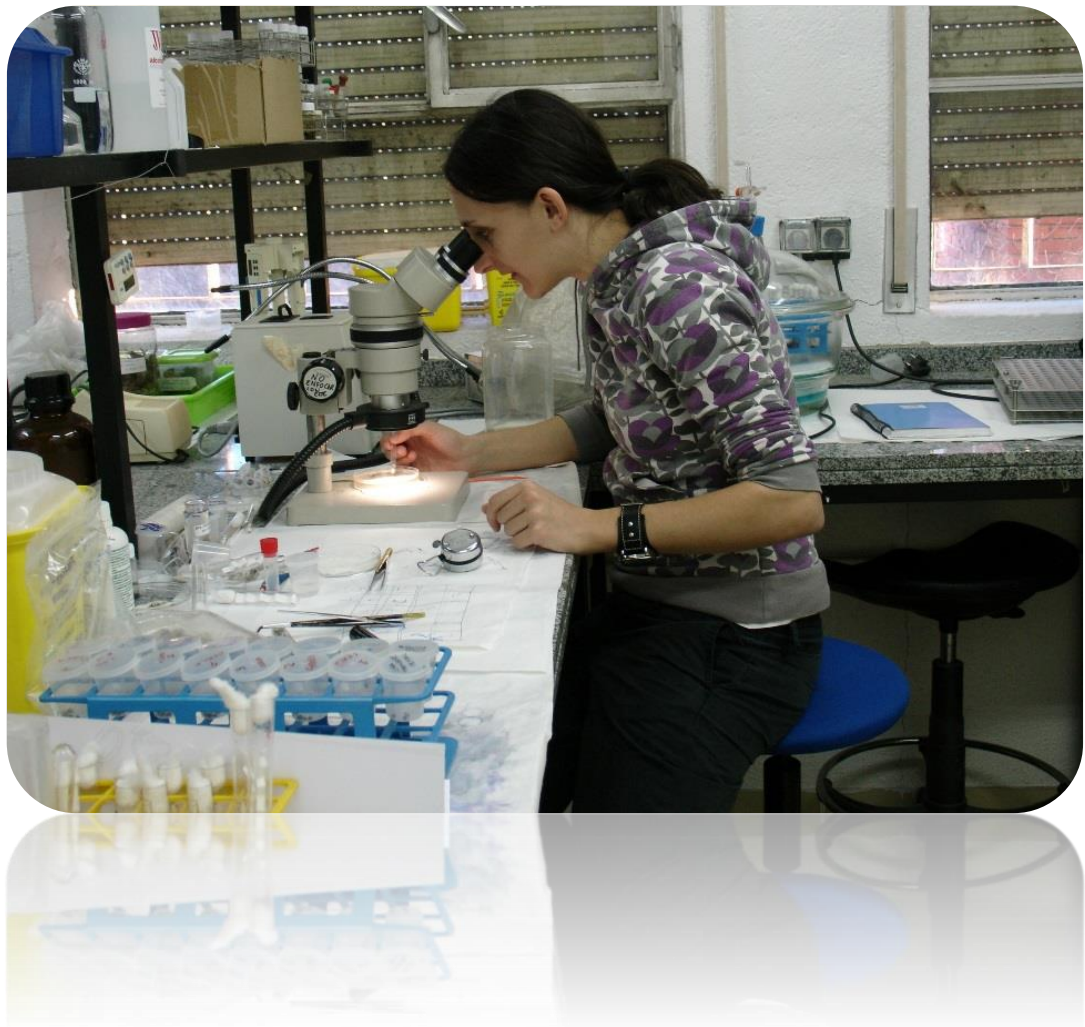
Además de la detección de la presencia de estos posibles hospedadores intermediarios de Anoplocefálidos, se realizaron técnicas moleculares de PCR para detectar la infección de los oribátidos tanto en condiciones naturales como experimentalmente en oribátidos mantenidos en laboratorio.

Los resultados obtenidos del estudio de la infección natural de los oribátidos, corroboran los obtenidos en la dinámica estacional de *A. perfoliata* en los équidos, ya que se identificó ADN parasitario en los meses de Noviembre, Enero, Febrero, Julio y Agosto, coincidentes con los periodos de riesgo de infección de los équidos. No obstante, en el mes de Febrero se alcanzan las mayores tasas de parasitación en los oribátidos, siendo el único mes en el que también fue detectada la presencia de ADN de *A. mamillana*.

Sólo se detectó *A. magna* en los meses de Julio y Agosto; sin embargo, al igual que sucede en el hospedador definitivo, *A. perfoliata* fue la que con mayor prevalencia se encontró parasitando a los oribátidos.

Las infecciones experimentales llevadas a cabo confirman que, a pesar de no haber podido visualizar los cisticercoides; mediante PCR se puede detectar ADN parasitario a los 30 días. Se corrobora la importancia de las familias Scheloribatidae, Oribatulidae y Galumnidae en el ciclo biológico de los Anoplocefálidos y permite afirmar que un oribátido parasitado puede sobrevivir más de dos meses.

8.SUMMARY



The equines harbor many helminth parasite species; those living in the digestive tract are the most common causing a variety of clinical signs some of them very severe such as digestive colics. The presence of helminth parasites has been associated with a wide range of damage, not only restricted to the intestines but also, affecting other organs as a consequence of the extraintestinal migrations of some species during their life cycles.

The most important consequence of the abdominal disorders is the colic. The importance of the colic syndrome is due to its high prevalence and can be produced by many different causes one of them are the helminth parasites. Depending on the parasite species, there are quite different disorders; i.e. adult *Parascaris equorum* can produce impactions, obstructions, invaginations and intestinal ruptures in the small intestine.

The migrating larval stages of other important species – *S. vulgaris* – can be responsible for intermittent colics, motility alterations or peritonitis due to thrombi at the cranial mesenteric artery.

The colic may also appear as result of the infection by cyathostomins, that produce cecumcecal and cecocolics intususceptions.

Some other helminth parasites can be responsible of intestinal problems with colic signs in the host. The infection by *Anoplocephala perfoliata* can be manifested by colics from ileal, ileocecal and cecumcolic invaginations, torsions or peritonitis. Moreover, this Anoplocephalid may cause ileal invaginations, ileocecum, cecumcecal and cecumcolics, torsions or peritonitis.

The knowledge of the some epidemiological factors of helminth infections in horses allows the establishment of control strategies for a correct parasite control. The prevalence of the colic in horses has decreased significantly after measures acting on the life cycle of the parasite species involved, as has occurred with the cyathostomins and *S. vulgaris*. However, there are many gaps in the knowledge of some equine cestode parasites causing infections that need an approach in order to know the infection in depth.

In the last decades, there has been an increase in the studies on different aspects of the infection by *Anoplocephala perfoliata*, especially when it was demonstrated that this parasite species lives around the ileocecum valve, and can be bring about colics because of the mucosal, submucosal damage and alterations in submucosal and myoenteric plexus.

A large number of studies have been undertaken focused on in pathogenic aspects and the clinical consequences of the infection in the horse. However, the prevalence of the infection is related to the area where the studies have been carried out. This is why, some years ago, one of UCM Faculty of Veterinary Medicine Animal Health Department research activities has been the relationship between horse Anoplocephalid infection and their consequences.

After some studies on cestode infections of horses in Spain, there are some data about the prevalence of the infection, the host age at which the animals are at risk, the parasite burden and the macro and microscopic lesions produced by *A. perfoliata*.

We have also studied several aspects of the exogenous life cycle, such as the egg survival in the environment, that was believed to be similar to the ruminant cestode species.

There are many oribatids which are intermediate hosts in the life cycle of the Anoplocephalids. The the seasonal pattern, the most prevalent genus involved in Anoplocephalid life cycle, the detection of the infection in the oribatids and the survival of the intermediate hosts were also studied.

The low sensibility of the faecal methods for the detection of the infection, encouraged us to carry out study *post mortem* studies in order to know the true prevalence of the infection. The results of necropsies let us knew the relationship between the host age and the infection by Anoplocephalids, the infection's intensity and the description of macro and microscopic lesions due to the presence of *A. perfoliata* adults around the ileocecal valve by using histological and immunohistochemical techniques.

After the identification of the Anoplocephalid species, during a year, the specimens identified as *A. perfoliata* were studied to know the sexual development and the seasonal dynamics of the infection in the horse.

Soil samples was also collected from a farm with a previous history of tapeworm infection by *A. perfoliata* with the objective of knowing the dynamic of oribatid mites throughout the year and factors involved under both field conditions and laboratory conditions.

The survival of *A. perfoliata* and *A. magna* eggs was also studied to relate the egg excretion and the oribatid infection and the time needed for the parasite development under different condition of temperature.

By means of the *post mortem* studies, the prevalence of the infection by Anoplocephalids in horses in Spain is 40%, *A. perfoliata* being more prevalent than *A.*

magna. The former infects horses of any age but is more prevalent in young animals. However, *A. magna* is found only young horses and immunocompromised animals.

The knowledge of the dynamics of the infection by *A. perfoliata* is of importance to assess the risk periods of the infection lasting from summer to winter months. This is the basis for control methods and avoid the pathogenic effects of the tapeworms around ileocecum valve.

The lesions range from focal erosions to necrotic areas depending on intensity of parasitism the most severe lesions are due to a large number of cestodes. Nevertheless, severe alterations can also be caused by a fairly low number of parasites (less than 30 cestodes) such as alterations in mioenteric and submucosus plexus causing a colic syndrome.

The parasite control measures in horses need an accurate knowledge not only of the clinical and pathological aspects of the infection, the age of the hosts and as many factors involved in parasite life cycle as egg's survival in the environment is needed as possible.

There is a clear need of relative humidity for the Anoplocephalid eggs to survive, but *A. perfoliata* survival is longer than that of *A. magna* under the same conditions. *A. perfoliata* eggs can survival more than 160 days (similar to the species infected ruminants) while those of *A. magna* remain alive 86 days. On the other hand, the survival capacity depend also of the temperature: the lower the temperature the longer the time surviving. This also happen even at frozen temperatures, despite there are some morphological changes like the loose of the external layer. This fact has been demonstrated in studies carried out to know the seasonal dynamic of *A. perfoliata* because of the eggs reaching environment in the faeces during the late winter and early spring.

Either the oncospheres or the whole eggs are ingested by the oribatid mites, the development proceed until the cysticercoid stages is reached; however, the epidemiological significance of the different genus of oribatids is different despite all a very common when organic material and humidity are present.

The highest number of oritibatids has been observed in winter and spring time with a peak in October. The most prevalent family was the family Scheloribatidae, followed by the family Oribatulidae in which there are seasonal differences, with a higher number of this mites during spring and autumn time. Species of the family Hemileiidae could only be collected in summer time, clearly showing different nutritional and climatic

requirements. No seasonal differences could be observed in oribatid mites of Galumnidae family.

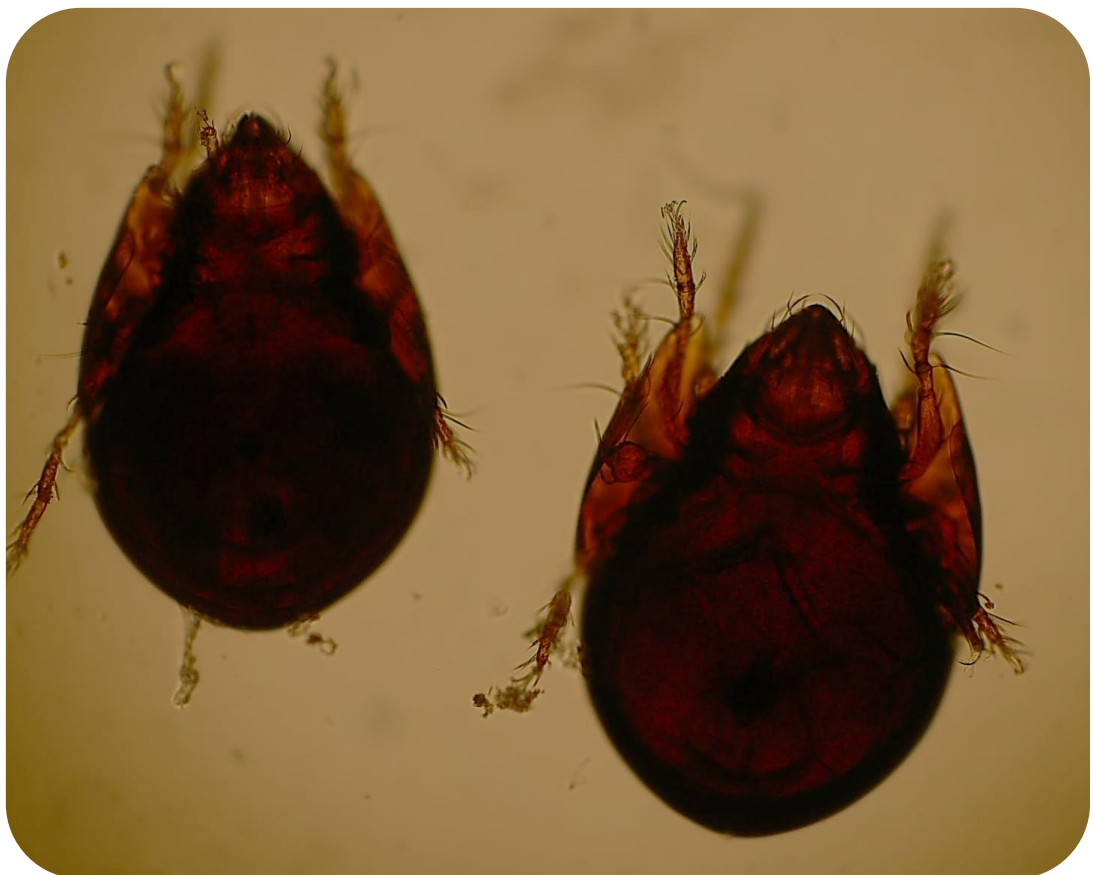
In addition to the study of the oribatids intermediate hosts of Anoplocephalids, molecular techniques (PCR) were carried out to identify those infected with cysticercoids under natural and laboratory conditions.

The results obtained with oribatid naturally infected match those of the seasonal dynamics of *A. perfoliata* in horses because in November, January, February, July and August the parasite DNA could be identify confirming the risk periods of infection for the horse. However, in February the highest infection rates were detected, *A. mamillana* being the only species present.

During the months of August and September *A. magna* was also detected but the most prevalent Anoplocephalid infecting the oribatids was *A. perfoliata*.

Under experimental infection studies the parasite DNA can be detected 30 days of the infection, despite the cysticercoid could not be observed. Our studies can confirm the role of the families Scheloribatidae, Oribatulidae and Galumnidae in the life cycle of the Anoplocephalid of equines so the infected oribatids lives more than two months.

9.BIBLIOGRAFÍA



Estilo Vancouver 2013

Abbott JB, Mellor DJ, Barrett EJ, Proudman CJ, Love S. Serological changes observed in horses infected with *Anoplocephala perfoliata* after treatment with praziquantel and natural reinfection. Vet Rec. 2008;162(2):50-53.

Al-Assiuty A, M Al, Seif AIM Combined effect of parasitism and desiccation on mortality of the soil-dwelling mites, *Scheloribates laevigatus* and *Galumna flabellifera*. Pedobiologia. 1995;39:185-192.

Akrami MA, Saboori A, Eslami A. Observations on oribatid mites (ACARI: ORIBATIDA) serving as intermediate hosts of *Moniezia expansa* (CESTODA: ANOPLOCEPHALIDAE) in Iran. Int J Acarol. 2007;33(4):365-369.

Andreeva MV, Akbaek MS. Ecology of the oribatid mites, intermediate hosts of anoplocephalids of horses. In: Belov AD (Ed) Aktual'nyye vorosy infekcionnykh i invazionnykh boleznei zivotnykh. Moscow: Moskow-skaja Veterinarnaja Akademija; 1993.

Arundel JH. Parasitic Diseases of the Horse. Sydney: Post-Graduate Foundation in Veterinary Science; 1878.

Arundel JH. Parasitic Diseases of the Horse. Sydney: Post-graduate Foundation in Veterinary Science; 1985.

Baer, J.G. Considérations sur le genre *Anoplocephala*. Bulletin de la Société Neuchâteloise des Sciences Naturelles. 1923;48:1-16.

Balogh J. The Oribatid Genera of the World. Budapest: Akad Kiado; 1972.

Bain SA, Kelly JD. Prevalence and pathogenicity of *Anoplocephala perfoliata* in a horse population in South Auckland. N Z Vet J. 1977;25(1-2):27-28.

Barbosa OF. Estudo dos Ciatostomíneos (Strongylidae, Cyathostominae) Parasitos de Equinos (*Equus caballus*) da Região de Jaboticabal.. São Paulo, Brazil. Dissertação de Mestrado: Universidade Estadual Paulista; 1995.

Barclay WP, Phillips TN, Foerner JJ. Intussusception associated with *Anoplocephala perfoliata* infection in five horses. J Am Vet Med Assoc. 1982;180(7):752-753.

Barus V. Helmintofauna koni v Československu. Cesk Parazitol. 1962;9:15-94.

Bashkirova EJ. Contribution to the study of the biology of the tapeworm *Anoplocephala perfoliata* (Goeze, 1782), parasitic in the horse. Comptes Rendus De L Academie Des Sciences De L URSS 1941;30:576-578.

Behan-Pelletier V, Newton G. Linking soil diversity and ecosystem functions the taxonomic dilemma. BioScience. 1999;49:149-153.

Bello TR. Perspectives in current equine anthelmintic therapy: Misunderstandings and clarification. In: Proceedings 25th Ann Meet Am Assoc Equine Pract. 1979;261-265.

Bello TR. Endoparasitism. In: Catcott (Ed). Equine medicine and surgery 3rd ed Santa Barbara, Calif: American Veterinary Publications 1982;67-85.

Benton RE, Lyons ET. Survey in central Kentucky for prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in horses at necropsy in 1992. Vet Parasitol. 1994;55(1-2):81-86.

Beroza GA, Barclay WP, Phillips TN. Cecal perforation and peritonitis associated with *Anoplocephala perfoliata* infection in three horses. J Am Vet Med Assoc. 1983;183(7):804-806.

Beroza GA, Williams R, Marcus LC, Mille P. Prevalence of tapeworm infection and associated large bowel disease in horses. In: Proceedings of the 2nd Equine Colic Symposium. 1985:21-25.

Biglietti G, Garbanati B. Cecocolic intussusception in a thoroughbred yearling. Equine Pract. 2000;22:26-27.

Blanchard R. Notices helminthologiques (deuxième série). Mémoires de la Société Zoologique de France. 1891;4:420-466.

Blond-Riou F, Flochay A. Interest of a new combination of moxidectina and praziquantel in the control of mixed tapeworm infection and heavy strongyle challenge in horses. In: Proceedings of the 19th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 2003;88.

Boch J, Supperer R. Parasitología en medicina veterinaria. Buenos Aires: Hemisferio Sur; 1988.

-
- Bohorquez A, Meana A, Luzon M. Differential diagnosis of equine cestodosis based on E/S and somatic *Anoplocephala perfoliata* and *Anoplocephala magna* antigens. Vet Parasitol. 2012;190(1-2):87-94.
- Borchert A. Parasitología veterinaria. Zaragoza: Acribia;1981.
- Borgsteede FHM, Van Beek G. Data on the prevalence of tapeworm infestations in horses in the Netherlands. Vet Q. 1996;18(3):110-112.
- Boxell AC, Gibson KT, Hobbs RP, Thompson RCA. Occurrence of gastrointestinal parasites in horses in metropolitan Perth, Western Australia. Aust Vet J. 2004;82(1-2):91-95.
- Bowman D. Georgis' Parasitology for Veterinarians. 9ª ed. St. Louis: Saunders Elsevier; 2009.
- Bucknell DG, Gasser RB, Beveridge I. The prevalence and epidemiology of gastrointestinal parasites of horses in Victoria, Australia. Int J Parasitol. 1995;25(6):711-724.
- Burns GN, Karcher LF, Cummings JF. Equine myoenteric ganglionitis: a case of chronic intestinal pseudo-obstruction. Cornell Vet. 1990;80:53-63.
- Caley J. Ultrastructural studies of cysticeroid of *Moniezia-expansa* (Anoplocephalidae) with special reference to development of cyst. Zeitschrift Fur Parasitenkunde-Parasitology Research. 1976;48(3-4):251-262.
- Carmel DK. Tapeworm infection in horses. J Equine Vet Sci. 1988; 8:343.
- Chowdhury AB, Dasgupta B, Ray HN, Bhaduri NV. Studies on the hexacanth embryo of *Taenia saginata* and its eclosing membranes. Journal of the Indian Medical Association. 1956;26:295-301.
- Christl Jr H. Intestinal rupture in a mare following massive infestation with *Anoplocephala perfoliata*. Berl Munch Tierarztl Wochenschr. 1971;84(16):305-307.
- Clayton HM Ascarids. Vet Clin N Am Equine Pract. 1986;2: 313-328.
- Cleale R, Heaney K, Hutchens D, Hutchinson, Klei M, Levot T, et al. Dose confirmation and field efficacy studies of a 2% moxidectin/12,5% praziquantel oral gel formulation
-

against *Anoplocephala spp.* and other equine parasites. In: Proceedings of the 48th Annual Meeting of the American Association of Veterinary Parasitologist. 2003; 48.

Cohen ND, Matejka PL, Honnas CM, Hooper RN. Case control study of the association between various management factors and development of colic in horses. J Am vet med Ass. 1995; 206:667-673.

Coles GC, Hillyer MA, Taylor FGR, Villard I. Efficacy and interest of an ivermectin-praziquantel combination in equids. In: Proceedings of the 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. 2001;169.

Coles GC, Hillyer MH, Taylor FGR, Villard I. Efficacy of an ivermectin-praziquantel combination in equids against bots and tapeworms. Vet Rec. 2003;152:178-179.

Collobert-Laugier C, Hoste H, Sevin C, Dorchies P. Prevalence, abundance and site distribution of equine small strongyles in Normandy, France. Vet Parasitol. 2002;110:77–83.

Coman BJ. The survival of *Taenia pisiformis* eggs under laboratory conditions and in the field environment. Aust Vet J. 1975;51:560-565.

Cosgrove JS, Sheeran JJ, Sainty TJ. Intussusception associated with infection with *Anoplocephala perfoliata* in a two year old thoroughbred. Irish Vet J. 1986;40:35-36.

Craig TM, Scrutchfield WL, Thompson JA, Bass EE. Comparison of Anthelmintic Activity of Pyrantel, Praziquantel, and Nitazoxanide against *Anoplocephala perfoliata* in Horses. J Eq Vet Sci. 2003;23(2):68-70.

Craig R, Reinemeyer G, Nielsen MK. Parasitism ad colic. Vet Clin Equine. 2009;25:233-345.

Darcoso F, Langenegger P, Guimaraes JH. Ocorrência de cestódeos em equídeos necropsiados na Escola Nacional de Veterinária. Arg Inst Biol An Rio de Janeiro. 1961;4:65-67.

Dawson K. A non-lethal method for assessment of efficacy of antiparasitics against parasites in horses such as *Anoplocephala perfoliata* and *Gasterophilus intestinalis*. Vet Parasitol. 2003;115(1):67-70.

Denegri GM Review of oribatid mites as intermediate hosts of tapeworms of the Anoplocephalidae. Exp Appl Acarol. 1993: 567-580.

Denegri GM Definition of scientific research program in Parasitology: about the biology of tapeworm in the Anoplocephalidae family [PhD. Thesis] Universidad La Plata; 1991.

Douthitt H. Studies on the cestode family Anoplocephalidae. Illin Biol Monogr. 1915;1:1-96.

Drogemuller M, Beelitz P, Pfister K, Schnieder T, Samson-Himmelstjerna GV. Amplification of ribosomal DNA of Anoplocephalidae: *Anoplocephala perfoliata* diagnosis by PCR as a possible alternative to coprological methods. Vet Parasitol. 2004;124(3-4):205-215.

Duncan JL, Pirie HM. The life cycle of *Strongylus vulgaris* in the horse. Res Vet Sci. 1972;13:374-379.

Dunn AM. Veterinary Helminthology. 2^a ed. Londres; William Heinemann Medical Books LTD. 1978.

Dunsmore JD, Jue Sue LP. Prevalence and epidemiology of the major gastrointestinal parasites of horses in Perth, Western Australia. Equine Vet J. 1985;17(3):208-213.

Ebermann E. Oribatiden (Oribatei, Acari) als Zwischenwirte des Murmeltier_Bndwurmes *Ctenotaenia marmotae* (Frohlich, 1802). Z Parasitenk. 1976;50: 303-312.

Edwards GB. Surgical management of intussusception in the horse. Equine Vet J. 1986;18(4):313-321.

Egwang T, Slocombe JOD. Evaluation of the Cornell-Wisconsin centrifugal flotation technique for recovering trichostrongylid eggs from bovine feces. Vet Parasitol. 1982;46:133-137.

Ejtminavcjute I. O zarazennosti oribatid (Oribatei) larvocistami moniezij v estestvennych uslovijach. Acta Parasitologia Lithuanica. 1963;6:155-158. [Abstract in English].

Erhov VS. Textbook of Veterinary clinical parasitology. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 1956.

Faleiros RR, Matos JJRT, de Alves G, Santos R de L. *Anoplocephala magna* (Abildgaard, 1789) related to a case of equine acute abdomen. Revista Brasileira de Medicina Veterinaria. 2000;22(1):27-29.

Fogarty U, Del Piero F, Purnell RE, Mosurski KR. Incidence of *Anoplocephala perfoliata* in horses examined at an Irish abattoir. Vet Rec. 1994;134(20):515-518.

Foster AO, Pedro Ortiz O. A further report on the parasites of a selected group of equines in Panama. J Parasitol. 1937;234):30-34.

Frayssinet L, Grisi L, White CR. Efficacy of an ivermectin+praziquantel oral paste against three tapeworm species of horses. In: Proceedings of the 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology 2001;170.

French DD, Chapman MR. Tapeworms of the equine gastrointestinal tract. Comp Cont Educ Pract. 1992; 14:655-661.

French DD, Chapman MR. Tapeworms of the equine gastrointestinal tract. The compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. 1992 14:655-661.

Fritz GN. Cysticercoid-carrying mites (Acari: Oribatida) found on pastures harboring goats infected with *Moniezia expansa* (Cestoda: Anoplocephalidae). [Master's Thesis]. USA: University of Florida Department of Entomology; 1982.

Fukui M, Keneko C, Ogawa A. Studies on equine tapeworms and their intermediate hosts (1) Studies on the incidence of equine tapeworms, *Anoplocephala perfoliata* Goeze, 1782 and *Anoplocephala magna* Abildgaard 1789 and the experimental studies on the removal of these cestodes with bithionol. J Parasitol. 1960(9):190-194.

Fukui M, Keneko C, Ogawa A. Studies on equine tapeworms and their intermediate hosts (2) Studies on removal effect of bithionol, bithionol acetate and dichlorophen for equine tapeworms, *Anoplocephala perfoliata*, J Parasitol. 1960;(9):217-223.

Gallie GJ, Sewell MMH. A technique for hatching *Taenia hydatigena* eggs. Vet Rec. 1970;78:343-354.

Gawor JJ. The prevalence and abundance of internal parasites in working horses autopsied in Poland. Vet Parasitol. 1995;58(1-2):99-108.

Gammel MA, Lawson JR, Roberts MG. Population dynamics in echinococcosis and cysticercosis: evaluation the biological parameters of *Taenia hydatigena* and *T. ovis* and comparison with those of *Echinococcus granulosus*. Parasitology. 1987;94:161-180.

Getachew AM, Innocent G, Proudman CJ, Trawford A, Feseha G, Reid SWJ, et al. Field efficacy of praziquantel oral paste against naturally acquired equine cestodes in Ethiopia. *Parasitol Res.* 2013;112(1):141-146.

Getachew AM. Endoparasites of working donkeys in Ethiopia: epidemiological study and mathematical modelling [PhD Thesis]. UK: University of Glasgow; 2006.

Getachew AM, Feseha G, Trawford A, Reid SWJ. Gastrointestinal parasites of working donkeys of Ethiopia. *Trop Anim Health Prod.* 2010;42:27-33.

Ghilarov, M.S, D.A. Krivolutsky. Claves de identificación de ácaros edáficos Sarcopteriformes. Moscú: Nauka;1975.

Grubbs ST, Amodie D, Rulli D, Wulster-Radcliffe M, Reinemeyer C, Yazwinski T, et al. Field evaluation of moxidectin/praziquantel oral gel in horses. *Vet Ther.* 2003;4(3):249-256.

Hass DK. Equine parasitism. *Vet Med Sm Anim Clin.* 1979;75:980-988.

Healt DD, Smyth JD. In vitro cultivation of *Echinococcus granulosus*, *Taenia hydatigena*, *T.ovis*, *T. pisiformis* and *T.serialis* from the oncosphere to cystic larva. *Parasitology.* 1970;61:329-343.

Hillyer MH, Taylor FG, French NP. A cross-sectional study of colic in horses on thoroughbred training premises in the British Isles in 1997. *Equine Vet J.* 2001;33:380-385.

Höglund J, Nilsson O, Ljungström B-, Hellander J, Osterman Lind E, Uggla A. Epidemiology of *Anoplocephala perfoliata* infection in foals on a stud farm in south-western Sweden. *Vet Parasitol.* 1998;75(1):71-79.

Houffschmitt Ph, Merciel P, Grisi L. Cestodicidal efficacy of praziquantel combined with ivermectin. In: *Proceedings of the 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology.* 2001;156.

Ihler CF, Rootwelt V, Heyeraas A, Dolvik NI. The prevalence and epidemiology of *Anoplocephala perfoliata* infection in Norway. *Vet Res Commun.* 1995;19(6):487-494.

Ilsoe B, Kyvsgaard NC, Nansesn P, Henriksen SA. A study on the survival of *Taenia saginata* eggs on soil in Denmark. *Act Vet Scand.* 1990;31:153-158.

Isobé M. On the casting process of the embryo of *Taenia saginata* out of its shell in the alimentary canal of mammals, as well as the resistance of the egg. Transactions of the Japanese Pathological Society. 1922;12:41-43.

Isoda MS, Watanabe; Ookubo K. Biology and pest control of *Anoplocephala perfoliata* on horse. Bulletin of Livestock Hygiene and Parasitological Institute. 1966;(1);1-18.

Jelenova I. The Effect of Temperature and Relative-Humidity on the Survival of Eggs of the Cestode *Moniezia-expansa* (Rudolphi, 1810). Vet Med. 1991;36(5):291-296.

Johnston DE. Synopsis and classification of living organisms. New York: MacGraw-Hill Inc: 1982.

Kassai T, Mahunka S. Studies on tapeworms in ruminants. Oribatid as intermediate hosts of *Moniezia* species. Acta Veterinaria Hungarica. 1965;16:227-249.

Kates KC, Runkel CE. Observations on oribatid mite vectors of *Moniezia expansa* on Pastures, with a report of several new vectors from the United-States. In: Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 1948;10-33.

Kazlauskas J. Lietuvos TSR arkliu helmintu fauna. Acta Parasitol Lit.1958;1:85-89.

Kjær LN, Lungholt MM, Nielsen MK, Olsen SN, Maddox-Hyttel C. Interpretation of serum antibody response to *Anoplocephala perfoliata* in relation to parasite burden and faecal egg count. Equine Vet J. 2007;39(6):529-533.

Klei T. Other parasites: recent advances. Veterinary Clinics of North America, Equine Practice. 1986; 2:329-336.

Kornaś S, Cabaret J, Skalska M, Nowosad B. Horse infection with intestinal helminths in relation to age, sex, access to grass and farm system. Vet Parasitol. 2010;174(3-4):285-291.

Krull WH. Investigations on possible intermediate hosts, other than oribatid mites for *Moniezia expansa*. In: Proceedings of the Helminthological Society of Washington. 1940:68-7.

Kuzmina TA, Kharchenko VA, Starovir AI, Dvoynos GM. Analysis of the strongylid nematodes (Nematoda: Strongylidae) community after deworming brood horses in Ukraine. *Vet Parasitol.* 2005;131:283-290.

Kuznecov ML. Development time of *Moniezia cyscitercoids* in oribatid mites of the species *Scheloribates laevigatus* under natural conditions. In: Bulanov-Zachvatkina (Ed). *Oribatidy (Oribatei), ichrol'v pocvoobrazovatel'nyh processach*. Vil'njus: Akad Nausk Litovskoj SSR; 1970.p.223-227.

Lanfredi RM. Estudo dos Ciatostomíneos Parasitos de Cabalos (*Equus caballus*, L 1758) no Município de Itaguaí, (Nematoda, Strongylidae, Cyathostominae) Rio de Janeiro, Brazil. [Dissertação de Mestrado]. Brazil: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 1983.

Laws GF. The hatching of *Taeniid* eggs. *Exp Parasitol.* 1968;23:1-10.

Lichtenfels JR. Helminths of Domestic Equids: Illustrated Keys to genera and species with emphasis on North American forms. In: *Proceedings of the Helminthological Society of Washington*. 1975;1-92.

Longhofer S. Review of US efficacy and safety studies with Equimax (ivermectin-praziquantel). In: *Proceedings of the Equimax Symposium 19th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*. 2003;12-14.

Lyons ET, Tolliver SC, Drudge JH, Swerczek TW, Crowe MW. Parasites in Kentucky Thoroughbreds at necropsy: emphasis on stomach worms and tapeworms. *Am J Vet Res.* 1983;44(5):839-844.

Lyons ET, Drudge JH, Tolliver SC, Swerczek TW, Crowe MW. Prevalence of *Anoplocephala perfoliata* and lesions of *Draschia megastoma* in Thoroughbreds in Kentucky at necropsy. *Am J Vet Res.* 1984;45(5):996-999.

Lyons ET, Tolliver SC, Drudge JH, Swerczek TW, Crowe MW. Prevalence of some internal parasites recovered at necropsy of Thoroughbreds born in 1982 in Kentucky. *Am J Vet Res.* 1985;46(3):679-683.

Lyons ET, Drudge JH, Tolliver SC. Pyrantel pamoato: Evaluating its activity against equine tapeworms. *Vet Med.* 1986;81:280-285.

Lyons ET, Tolliver SC, Drudge JH, Swerczek TW, Crowe MW. Common internal parasites found in the stomach, large intestine, and cranial mesenteric artery of thoroughbreds in Kentucky at necropsy (1985 to 1986). *Am J Vet Res.* 1987;48(2):268-273.

Lyons ET, Tolliver SC, Drudge JH, Grastrom DE, Stamper S. Activity of praziquantel against *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda) in horses. *J Helminthol Soc Wash.* 1992;59:1-4.

Lyons ET, Tolliver C, Stamper S, Drudge JH, Granstrom DE, Collins SS. Activity of praziquantel (0.5 mg kg⁻¹) against *Anoplocephala perfoliata* (Cestoda) in equids. *Vet Parasitol.* 1995;56(1-3):255-257.

Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS, Drudge JH, Granstrom DE. Transmission of some species of internal parasites in horses born in 1993, 1994, and 1995 on the same pasture on a farm in central Kentucky. *Vet Parasitol.* 1997;70(4):225-240.

Lyons ET, Tolliver SC, McDowell KJ, Drudge JH. Atypical external characteristics of *Anoplocephala perfoliata* in equids in central Kentucky. *J Helminthol Soc Wash.* 1997;64(2):287-291.

Lyons ET, Tolliver SC, McDowell KJ, Drudge JH. Field test of activity of the low dose rate (2.64 mg/kg) of Pyrantel tartrate on *Anoplocephala perfoliata* in thoroughbreds on a farm in Central Kentucky. *J Helminthol Soc Wash.* 1997;64(2):283-285.

Lyons ET, Tolliver SC, McDowell KJ, Drudge JH. External anomalies of *Anoplocephala perfoliata* from remainder of a collection from equids in Kentucky with notes on *Anoplocephala magna*. *Vet Parasitol.* 1998;76(1-2):159-161.

Lyons ET, Swerczek TW, Tolliver SC, Bair HD, Drudge JH, Ennis LE. Prevalence of selected species of internal parasites in equids at necropsy in central Kentucky (1995-1999). *Vet Parasitol.* 2000;92(1):51-62.

Lyons ET, Swerczek TW, Tolliver SC. Parasitologic examination of the eyes, esophagus, lungs, rumen, and feces of cattle and of the small intestine of horses at necropsy in Central Kentucky, U.S.A., in 2000 and 2001. *Comp Parasitol.* 2003;70(1):55-59.

Lyons ET, Tolliver SC, Collins SS. Prevalence of large endoparasites at necropsy in horses infected with Population B small strongyles in a herd established in Kentucky in 1966. *Parasitol Res.* 2006;99(2):114-118.

Lühe M. *Die Süßwasserfauna Deutschlands. Heft 18: Parasitische Plattwürmer. II. Cestoden.* Gustav Fischer Verlag, Jena.1910.[Abstract in English]

Mackiewicz JS. Cestode transmission patterns. *J Parasitol.* 1988;74(1),60-71.

Mair TS, Sutton DG, Love S. Caecocaecal and caecocolic intussusceptions associated with larval Cyathostomiasis in four young horses. *Equine Vet J Supl.* 2000 (32):77-80.

Maraun M, Scheu S, Heinrich S. Awesome or ordinary? Global diversity patterns of oribatid mites. *Ecography.* 2007;30:209-216.

Marchiondo AA, White GW, Smith LL, Reinemeyer CR, Dascanio JJ, Johnson EG, et al. Clinical field efficacy and safety of pyrantel pamoate paste (19.13% w/w pyrantel base) against *Anoplocephala* spp. in naturally infected horses. *Vet Parasitol.* 2006;137(1-2):94-102.

Marley SE, Hutchens DE, Reinemeyer CR, Holste JE, Rehbein Paul AJ. Antiparasitic activity of an ivermectin and praziquantel combination paste in horses. *Vet Ther.* 2004;(5);2:105-119.

Matthews JB, Hodgkinson JE, Dowdall SMJ, Proudman CJ. Recent developments in research into the Cyathostominae and *Anoplocephala perfoliata*. *Vet Res.* 2004;35(4):371-381.

Meana A. Programas de control antiparasitario. *Equinus.* 2008;22(3):72-84.

Meana A, Luzon M, Corchero J, Gómez-Bautista M. Reliability of coprological diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection. *Vet Parasitol.* 1998;74(1):79-83.

Meana A, Pato NF, Martín R, Mateos A, Pérez-García J, Luzón M. Epidemiological studies on equine cestodes in central Spain: Infection pattern and population dynamics. *Vet Parasitol.* 2005;130(3-4):233-240.

Meana A, Bohórquez A, Luzón M, Martín Hernández R. Specific diagnosis of three equine tapeworms by multiplex PCR.2013 (in press).

Meyers AF. Physical observations on *Echinococcus* eggs. A simple method for the determination of viability. *J Parasitol.*1957;43:322-323.

Mfitilodze MW, Hutchinson GW. Prevalence and intensity of non-strongyle intestinal parasites of horses in northern Queensland. Aust Vet J. 1989;66(1):23-26.

Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. Manual of veterinary parasitological laboratory techniques. London.HMSO. 1987.

Mitchell MJ. Energetics of oribatid mites (Acari: Cryptostigmata) in an aspen woodland soil. Pedobiologia. 1979; 19:89-98.

Monning HO. Three new helminthes. Transactions of the Royal Society of South Africa. 1925;13(3):291-298.

Narsapur VS. Pathogenesis and biology of Anoplocephaline cestodes of domestic animals. Ann Rec Vet. 1988;19, 1-17.

Negita T, Ito A. In vitro hatching of oncospheres of *Taenia pisiformis* using eggs isolated from fresh, frozen, formalin-fixed and ethanol-fixed segments. J Helminthol. 1994;68:271-272.

Neveu-Lemaire M. Traité d'Helminthologie Médicale et Vétérinaire. París: Vigot Frères; 1936.

Nilsson O, Ljungström BL, Höglund J, Lundquist H, Uggla A. *Anoplocephala perfoliata* in horses in Sweden: prevalence, infection levels and intestinal lesions. Acta Vet Scand. 1995;36(3):319-328.

Nielsen UN, Osler GHR, Campbell CD, Burslem DFRP, van der Wal R. Predictors of fine-scale variation in soil mite and microbe community composition differ between biotic groups and habitats. Pedobiologia. 2012;55:83-91.

Norton N, Behan-Pelletier VM. Suborder Oribatida. In: Kranz GW, Walter DE (eds). A Manual of Acarology. Texas: Technical University Press Lubbock;2009.p.430-564.

Oliver DF, Jenkins CT, Walding JP. Duodenum rupture in a nine-month-old colt due to *Anoplocephala magna*. Vet Rec. 1977;101(4):80.

Owen RA, Jagger DW, Quan-Taylor R. Caecal intussusceptions in horses and the significance of *Anoplocephala perfoliata*. Vet Rec. 1989;124(2):34-37.

Owen RA, Jagger DW, Quan-Taylor R. Prevalence of *Anoplocephala perfoliata* in horses and ponies in Clwyd, Powys and adjacent English marches. Vet Rec. 1988;123(22):562-563.

Owen J, Slocombe D. A modified critical test and its use in two dose titration trials to assess efficacy of praziquantel for *Anoplocephala perfoliata* in equids. Vet Parasitol. 2006; 136:127-135.

Owen J, Slocombe D, Josef Heine, Barutzki Dieter, Slacek Brigitte. Clinical trials of efficacy of praziquantel horse paste 9% against tapeworms and its safety in horses. Vet Parasitol. 2007;144:366-370.

Papazahariadou M, Papadopoulos E, Diakou A, Ptochos S. Gastrointestinal parasites of stabled and grazing horses in central and northern Greece. J Equine Vet Sci. 2009;29(4):233-236.

Pavone S, Veronesi F, Genchi C, Fioretti DP, Brianti E, Mandara MT. Pathological changes caused by *Anoplocephala perfoliata* in the mucosa/submucosa and in the enteric nervous system of equine ileocecal junction. Vet Parasitol 2011;176(1):43-52.

Pavone S, Veronesi F, Piergili Fioretti D, Mandara MT. Pathological changes caused by *Anoplocephala perfoliata* in the equine ileocecal junction. Vet Res Commun 2010;34 Suppl 1:53-56.

Pearson GR, Davies LW, White AL, O'Brien JK. Pathological lesions associated with *Anoplocephala perfoliata* at the ileo-caecal junction of horses. Vet Rec. 1993;132(8):179-182.

Pecheur M, detry-Poupland M, Geri NG, Tina R. Les helminthes parasites du système digestif de poneys abbatus en Belgie. Ann Med Vet. 1979;123:103-108.

Pereira JR, Vianna SSS. Gastrointestinal parasitic worms in equines in the Paraíba Valley, State of São Paulo, Brazil. Vet Parasitol. 2006;140(3-4):289-295.

Proudman CJ. A two year, prospective survey of equine colic in general practice. Equine Vet J. 1991;24(2) 90-93.

Proudman CJ, Edwards GB. Validation of a centrifugation/flotation technique for the diagnosis of equine cestodiasis. Vet Rec. 1992 (25): 224-226.

Proudman CJ, Holmes MA, Sheoran AS, Edwards SER, Trees AJ. Immunoepidemiology of the equine tapeworm *Anoplocephala perfoliata*: Age-intensity profile and age-dependency of antibody subtype responses. *Parasitology*. 1997;114(1):89-94.

Proudman CJ, French NP, Trees AJ. Tapeworm infection is a significant risk factor for spasmodic colic and ileal impaction colic in the horse. *Equine Vet J*. 1998;30(3):194-199.

Proudman CJ, Trees AJ. Tapeworms as a cause of intestinal disease in horses. *Parasitology Today*. 1999;15(4):156-159.

Rajski A. Mechowce (Acari: Oribatei) jako żywiciele pośredni tasiemcow (Cestodes: Anoplocephalata) w świetle literatury. *Zesz Nauk UAM Biologii Poznań*. 1959;2:163-192.[Abstract in English].

Read CP. Nutrition of intestinal helminthes. In: *Biology of Parasites*. Soulsby EJJ (ed). New York:Academic Press; 1966.p.101-126.

Reeves M, Salman M, Smith G. Risk factors for acute equine colic: Results of a multi-centre case control study. *Prev Vet Med*. 1996;26(3-4):285-301.

Rehbein S, Lindner T, Visser M, Winter R. Evaluation of a double centrifugation technique for the detection of *Anoplocephala* eggs in horse faeces. *J Helminthol*. 2011; 85(4):409-14.

Rehbein S, Visser M, Winter R. Prevalence, intensity and seasonality of gastrointestinal parasites in abattoir horses in Germany. *Parasitol Res*. 2013;112(1):407-413.

Reinemeyer CR, Smith SA, Gabel AA, Herd RP. The prevalence and intensity of intestinal parasites of horses in the USA. *Vet Parasitol*. 1984; 15:75-83.

Robert A Wardle RA, McLeod JA, Radinovsky S. *Advances in the Zoology of Tapeworms, 1950-1970*. Minneapolis: University of Minnesota Press; 1974.

Rodgers RW. Tapeworm infection causing intussusception in horse. *Mod Vet Pract*. 1966;(47):72-73.

Rodríguez-Bertos A, Corchero J, Castaño M, Peña L, Luzón M, Gómez-Bautista M, Meana A. Pathological alterations caused by *Anoplocephala perfoliata* infection in the ileocaecal junction of equids. *J Vet Med Serie A*. 1999;46(5):261-269.

- Romero J, Denegri G, Nuin C, Valera A, Espinosa G. Experimental reproduction of cysticeroids from *Anoplocephala perfoliata* Blanchard, 1848 in *Scheloribates* sp. Berlese, 1908 (Acarina-Oribatulidae). J Vet Med Serie B. 1989;36(6):442-446.
- Saliou, J.F. Le teniasis du cheval. Yber Vet. Med. 1928;2:1122-1929.
- Sanada Y, Aoki J. Distribution of oribatid mites as intermediate hosts of the horse tapeworm en pasture soils of Hidaka in Japan. J Acarol Soc JPN. 1999;8:159-163.
- Schatz H, Behan Pelletier V. Global diversity of oribatids (Oribatida:Acari: Arachnida). Hydrobiologia. 2008;595:323-328.
- Schneider K. Feeding biology and diversity of oribatid mites (Oribatida, Acari). [Doctoral Dissertation Thesis]. Germany: Technischen Universität Darmstadt; 2005.
- Sengbusch HG. Review of oribatid mite-anoplocephan tapeworm relationships (Acari; Oribatei; Cestoda; Anoplocephalidae). In: Proc. Symp Cast Brabch Ent. Soc Am. 1977;87-102.
- Schuster, R., Coetzee, L., Putterill, J.F. Oribatid mites (Acari, Oribatida) as intermediate hosts of tapeworms of the family Anoplocephalidae (Cestoda) and the transmission of *Moniezia expansa* cysticeroids in South Africa. Onderstepoort J Vet Res. 2000;67, 49-55.
- Schuster RK, Coetzee L. Cysticeroids of *Anoplocephala magna* (Eucestoda: Anoplocephalidae) experimentally grown in oribatid mites (Acari: Oribatida). Vet Parasitol. 2012;190(1-2):285-288.
- Shimano S. Oribatid mites (Acari: Oribatida) as an intermediate host of Anoplocephalid cestodes in Japan. Appl Entomol Zool. 2004;39(1):1-6.
- Silverman PH. Studies on the biology of some tapeworms of the genus *Taenia*. Factors affecting hatching and activation of taeniid ova, and some criteria of their viability. Ann Trop Med Parasitol. 1954;48:207-215.
- Slivinska K, Dvojnos G, Kopij G. Helminth fauna of sympatric Przewalski's Equus przewalskii Poljakov, 1881 and domestic horses E.caballus L. in the Chernobyk exclusion zona, Ukraine. Helminthologia. 2006;43: 27-32.

Slivinska K, Gawor J, Jaworski Z. Gastro-intestinal parasites in yearlings of wild Polish primitive horses from the Popielno Forest Reserve, Poland. *Helminthologia* 2009;46;(1):9-13.

Slocombe JOD. The critical test and efficacy of pyrantel pamoate for *Anoplocephala perfoliata* in equids. In: Joint meeting of the American Society of Parasitologists and the American Association of Veterinary Parasitologists. 1995;73.

Slocombe JOP. Prevalence and treatment of tapeworms in horses. *Can Vet J*. 1979;20:136-140.

Slocombe JOD, Heine J, Barutzki D, Slacek B. Clinical trials of efficacy of praziquantel horse paste 9% against tapeworms and its safety in horses. *Vet Parasitol*. 2007;144(3-4):366-370.

Smyth JD. Changes in the digestive-absorptive surface of cestodes during larval adult differentiation. *Symp BR Soc Parasit*. 1972;10:41-70.

Smyth JD. *Introduction to Animal Parasitology*. 3^o ed. Cambridge: Cambridge University Press; 1994.

Soulsby, E.J.L. *Helminos, artrópodos y protozoos de los animals domésticos*. México:Nueva Editorial Interamericana;1987.

Southwood LL; Ragle CA, Synder JP. Surgical treatment of ascarids impactions in foals and horses. In: *Proceedings of the 7th International Equine Colic Research Symposium* Manchester UK. 2002;112-113.

Stevenson P. Observations on the hatching and activation of fresh *Taenia saginata* eggs. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 1983;77:399-404.

Stoll, NR. Tapeworm studies II. Persistence of the pasture stage of *Moniezia expansa*. *American Journal of Hygiene*. 1935;22, 683-803.

Stroh A. Ein Beitrag zur örtlichen Verbreitung und zur Entwicklungsgeschichte der Pferdebandwürmer. *Zschr Infektionskr Haustiere*. 1923: 24(103–124):173–193.

Stunkard HW. The life cycle of *Moniezia expansa*. *Science*. 1937;86(2231):312.

Subías, L.S, J. Gil-Martín. Systematic and bio-geographic checklist on oribatids from Western Mediterranean (Acari, Oribatida). Ann Mus Civ Stor Nat "G. Doria". 1997;91: 459-498.

Summers BA, De Cummings JEm De Lahunta A. Diseases of the peripheral nervous system. In: Summers BA. De Cummings JF, De Lahunta (Eds). Veterinary Neuropathology. St Louis: Mosby; 1995.p.402-501.

Tinker MK, White NA, Lessard P, Thatcher CD, Pelzer KD, Davis B, Carmel D. Prospective study of equine colic incidence and mortality. Equine Vet J. 1997; 22:251-254.

Toguchi M, Yoshihara T, Otake K. Evaluation of anthelmintic efficacy of bithionol Paste against tapeworms naturally infected in horses, by fecal examination and necropsy; A Critical Trial. J Equine Sci. 2004;(15)2:37-41.

Tolliver S, Lyons E, Drudge J. Prevalence of internal parasites in horses in critical test of activity of parasiticides over a 28-year period (1956-1983) in Kentucky. Vet Parasitol. 1987;23:273-284.

Torbert BJ, Klei TR, Lichtenfels JR. A survey in Louisiana of intestinal helminthes of ponies with little exposure to anthelmintics. J Parasitol. 1986;72:926-930.

Travassos L. Esboço de uma chave geral de natatódeos parasitas Res Vet Zootec. 1919;10:59-75.

Trotz-Williams L, Physick-Sheard P, McFarlane H, Pearl DL, Martin SW, Peregrine AS. Occurrence of *Anoplocephala perfoliata* infection in horses in Ontario, Canada and associations with colic and management practices. Vet Parasitol. 2008;153(1-2):73-84.

Umur Ş, Açıci M. A survey on helminth infections of equines in the Central Black Sea region, Turkey. Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences. 2009;33(5):373-378.

Urquhart GM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW. Veterinary Parasitology 2^a ed. Oxford: Blackwell Science; 1996.

Urquhart GM. The production of experimental cysticercosis in calves in Kenya. Bulletin of Epizootic Diseases of Africa.1958;6:381-388.

Veit P, Bilger B, Schad V, Schäfer W, Frank W, Lucius R. Influence of environmental factors on the infectivity of *Echinococcus multilocularis* eggs. *Parasitol.* 1995;110:79-86.

Villard I, Boersema J, Buckle T, Farkas R, Gundlach JL, Hoglund J, Schuster R. Field efficacy of an ivermectin-praziquantel oral paste in horses. In: *Proceedings of the 18th International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology.* 2001;170.

Wang IC, Ma YX, Kuo CH, Fan PC. A comparative study on egg hatching methods and oncosphere viability determination for *Taenia solium* eggs. *Int J Parasitol.* 1997(27);11:1311-1314.

Wachira TM, Mac Pherson CNL, Gathuma JM. Release and survival of *Echinococcus* eggs in different environments in Turkana, and their possible impact on the incidence of hydatidosis in man and livestock. *J Helminthol.* 1991;65:55-61.

Wardle RA, McLeod JA, Radinovsky S. *Advances in the Zoology of Tapeworms, 1950-1970.* Minneapolis: University of Minnesota Press; 1974.

Williamson RMC, Gasser RB, Middleton D, Beveridge I. The distribution of *Anoplocephala perfoliata* in the intestine of the horse and associated pathological changes. *Vet Parasitol.* 1997;73:225-241.

Williamson RM, Beveridge I, Gasser RB. Coprological methods for the diagnosis of *Anoplocephala perfoliata* infection of the horse. *Aust Vet J.* 1998;76(9):618-621.

Williams JF, Colli CW. Primary cystic infection with *Echinococcus granulosus* and *Taenia hydatigena* in *Meriones unguiculatus*. *J Parasitol.* 1970;56:509-513.

Yoshihara TM, Oikama M, Hasegawa Y, Katayama, Kaneko M. Prevalence of some internal parasites recovered at necropsy from racehorse in Japan. *J Equine Sci.* 1994(5):49-52.